



ORGANISMO ANDINO DE SALUD - CONVENIO HIPÓLITO UNANUE
PROGRAMA "FORTALECIMIENTO DE LA RED DE LABORATORIOS
DE TUBERCULOSIS EN LA REGIÓN DE LAS AMÉRICAS"

GUÍA TÉCNICA

PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO
DE LA TUBERCULOSIS

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad

GUÍA TÉCNICA

**PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO
DE LA TUBERCULOSIS**

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad

Catalogación realizada por el Organismo Andino de Salud – Convenio Hipólito Unanue

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. Parte 3 Pruebas de Sensibilidad / Programa "Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas" -- Lima: ORAS - CONHU; 2017.

178 p.; ilus, tab.

DIAGNÓSTICO/ TUBERCULOSIS/ LABORATORIOS/ Fármacos, Pruebas de Sensibilidad, métodos/ REDES/ Bioseguridad

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú No. 2017-17772

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. Parte 3 Pruebas de Sensibilidad

Redacción

Lucía Barrera, Asesora Independiente.

Borrador inicial

Susana Balandrano, Laboratorio de Micobacterias, InDRE, Laboratorio Supranacional, Ciudad de México, México.

Revisión técnica

Beatriz López, Servicio de Micobacterias, INEI, ANLIS Dr C Malbrán, Laboratorio Supranacional, Buenos Aires, Argentina.

Fabiola Arias, Maritza Velazco. Sección Micobacterias, Instituto de Salud Pública de Chile, Laboratorio Supranacional, Santiago de Chile, Chile.

Claudia Backer, Laboratorio de Micobacterias, InDRE, Laboratorio Supranacional, Ciudad de México, México.

Susana Imaz, Laboratorio de Tuberculosis, INER E Coni, Centro Colaborador OPS/OMS, Santa Fe, Argentina

Ernesto Montoro, Coordinador Laboratorios de Tuberculosis, OPS.

Maria Alice Telles, Maria Delfina Sequeira, Omar Latini. Asesores independientes

Otras contribuciones

Modelos de procedimientos operativos estándares

Beatriz Lopez, Norberto Simboli INEI, ANLIS Dr C Malbrán, Laboratorio Supranacional, Buenos Aires, Argentina.

Ernesto Montoro, Coordinador Laboratorios de Tuberculosis, OPS.

Lucilaine Ferrazoli, Núcleo de Tuberculosis y Micobacteriosis, Instituto Adolfo Lutz, San Pablo, Brasil.

Fotografías

David Avendaño INEI, ANLIS Dr C Malbrán, Laboratorio Supranacional, Buenos Aires, Argentina

Álvaro Díaz, Sección Micobacterias, Instituto de Salud Pública de Chile, Laboratorio Supranacional, Santiago de Chile, Chile.

Susana Imaz, Laboratorio de Tuberculosis, INER E Coni, ANLIS Dr C Malbrán, Centro Colaborador OPS/OMS, Santa Fe, Argentina.

Ernesto Montoro, Coordinador Laboratorios de Tuberculosis, OPS.

Nilda Jiménez de Romero, Margarita Godoy, Ofelia Cuevas Laboratorio de Tuberculosis. Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, Paraguay.

ORGANISMO ANDINO DE SALUD – CONVENIO HIPÓLITO UNANUE, 2018

Av. Paseo de la República N° 3832, Lima 27 – Perú

Tel.: (00 51-1) 422-6862 / 611 3700

<http://www.orasconhu.org>

contacto@conhu.org.pe

Tiraje: 500 ejemplares

Se terminó de imprimir en abril 2018

Diseñarte, S.A de C.V.

Avenida la Capilla #331, Colonia San Benito, San Salvador

Teléfono: (+503) 2510-8500

Primera Edición, Abril 2018

Esta publicación se enmarca dentro de la ejecución del Programa "Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas" financiado por el fondo mundial de lucha contra el SIDA, la tuberculosis y la malaria, que tiene como Receptor Principal al Organismo Andino de Salud – Convenio Hipólito Unanue (ORAS - CONHU); y como Subreceptores a la Secretaría Ejecutiva del Consejo de Ministros de Salud de Centroamérica y República Dominicana (SE COMISCA) y a la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).

El contenido de este documento puede ser reseñado, resumido o traducido, total o parcialmente sin autorización previa, con la condición de citar específicamente la fuente y no ser usado con fines comerciales.

Derechos reservados conforme a Ley.

PREFACIO.....	9
DEFINICIONES.....	10
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	12
FUNDAMENTOS Y UTILIDAD DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD.....	13
El tratamiento de la tuberculosis y la generación de resistencia	13
Mecanismos de acción de los fármacos y de resistencia del bacilo.....	15
Fármacos para los que puede ocurrir resistencia cruzada.....	17
Isoniacida, etionamida/protionamida, tioacetazonas.....	17
Rifamicinas (rifampicina, rifabutina).....	17
Fluoroquinolonas.....	18
Inyectables: aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina, ampicacina) y capreomicina.....	18
Bedaquilina, clofazimina.....	18
β -lactámicos.....	18
Otros fármacos.....	18
Pirazinamida.....	18
Etambutol.....	19
PAS.....	19
Cicloserina.....	19
Probabilidad de encontrar mutantes resistentes.....	19
Indicación y utilidad de la prueba de sensibilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Principio de los métodos.....	22
Métodos que investigan el crecimiento del bacilo en medios con antibióticos.....	22
Método de las proporciones en medios sólidos.....	22
Prueba de nitrato reductasa.....	25
Adaptación del método de las proporciones en medios líquidos.....	25
Prueba de sensibilidad a la pirazinamida.....	26
Métodos moleculares.....	26
Precisión y significación clínica de los resultados.....	25
ORGANIZACIÓN DE LA OFERTA DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD	
EN LA RED DE LABORATORIOS.....	30
Logística.....	30
Agilización de los procedimientos del laboratorio.....	31
Selección de métodos y laboratorios.....	31
Infraestructura y equipamiento.....	35
Equipos e insumos.....	37
Recursos humanos.....	38
Sistema de registro.....	38
Algoritmo de trabajo.....	41

MATERIAL BIOLÓGICO A INVESTIGAR	43
Toma y conservación de muestras.....	43
Selección de aislamientos.....	43
Transporte de material biológico.....	43
INGRESO Y ORGANIZACIÓN DEL MATERIAL.....	45
IDENTIFICACIÓN DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.....	48
Prueba de inhibición del crecimiento con ácido p-nitrobenzoico en medio LJ	48
Detección de antígeno MPT64 por inmunocromatografía lateral.....	48
Prueba de sensibilidad a antibióticos e inhibidores químicos	52
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN MEDIOS SÓLIDOS	54
Preparación de suspensiones bacilares madres.....	54
A partir de muestras.....	54
A partir de aislamientos obtenidos en medios de cultivo.....	54
Dilución de las suspensiones bacilares madres.....	56
Método de las proporciones	57
En medio Löwenstein-Jensen.....	57
Inoculación e incubación.....	57
Método directo.....	57
Método indirecto.....	59
Inspección inicial de los tubos.....	60
Lectura y registro de los resultados.....	60
En medio Middlebrook 7H10	61
Inoculación e incubación.....	61
Método directo	61
Método indirecto	62
Inspección inicial de las placas.....	62
Lectura y registro de los resultados.....	63
Verificación de la calidad de la prueba.....	64
Cálculos e interpretación de los resultados.....	65
Prueba de pirazinamidasasa	79
Método de nitrato reductasa (ó de Griess).....	80
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN MEDIO LÍQUIDO	84
Método comercial MGIT.....	84
Preparación del inóculo.....	86
Lectura y registro de resultados.....	91
Lectura manual.....	91
Lectura automatizada.....	91

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD MOLECULARES.....	94
Métodos comerciales.....	94
Xpert MTB/Rif.....	94
LiPA.....	102
CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS.....	111
CONTROL DE CALIDAD INTERNO	114
Responsabilidades.....	114
Procedimientos operativos estándares.....	115
Puntos de control críticos	115
Aplicación de algoritmos.....	115
Procedimientos técnicos y registros.....	116
Demora.....	118
Informe de resultados.....	120
BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA	122
ANEXOS.....	125
Anexo I MEDIDAS MÍNIMAS DE BIOSEGURIDAD.....	125
Aptitud del personal.....	125
Infraestructura, instalaciones y equipamiento.....	126
Elementos de protección personal.....	128
Vestimenta.....	128
Protector respiratorio.....	128
Guantes.....	130
Botiquín para incidentes/accidentes.....	130
Prácticas en el laboratorio de contención de riesgo biológico.....	130
Ingreso.....	131
Dentro del laboratorio.....	131
Egreso.....	133
Limpieza y mantenimiento.....	133
Transporte de cultivos positivos.....	134
Anexo II. EQUIPAMIENTO.....	137
Computadoras, escáner.....	138
Cabina de esterilidad.....	138
Pass through.....	139
Autoclave en el área de contención de riesgo biológico.....	139
Refrigerador, (ultra)congelador.....	139
Micro balanza o balanza analítica.....	139
Micropipetas.....	140
Contador de personas o ganado.....	140
Lupa.....	141

Sellador de bolsas plásticas.....	141
Lámpara ultravioleta portable.....	141
MGIT 960 o 320.....	141
GeneXpert.....	141
Equipamiento para LiPA.....	141
Cabina para PCR.....	141
Microcentrífuga.....	142
Baño María o calentador con bloques.....	142
Termociclador.....	142
Aspirador de líquidos.....	142

Anexo III. MATERIAL DE VIDRIO, PLÁSTICO, OTROS..... 144

Botellas McCartney.....	144
Perlas de vidrio.....	144
Cajas de Petri.....	144
Desecador.....	144
Puntas para micropipetas.....	145
Microtubos.....	145
Cajas y gradillas para microtubos.....	145

Anexo IV. PREPARACIÓN DE MEDIOS Y REACTIVOS..... 146

Precauciones generales.....	146
Patrones turbidimétricos.....	147
Solución Mc Farland.....	147
BCG 1 mg/ml.....	147
Medios de cultivo con antibióticos e inhibidores selectivos.....	148
Principios.....	148
Solución madre.....	148
Diluyentes.....	151
Conservación.....	151
Concentraciones críticas.....	151
Medios de cultivo.....	151
Solución madre de los antibióticos e inhibidores selectivos.....	154
Pesado de las drogas y cálculos.....	155
Disolución de las drogas y conservación.....	156
Löwenstein Jensen con antibióticos o inhibidores selectivos.....	158
Löwenstein Jensen con I y R para la prueba de nitrato reductasa.....	160
Agar Middlebrook 7H10 con antibióticos.....	162
Medios y reactivos para la prueba de pirazinamidasa.....	165
MGIT con antibióticos para equipo MGIT 320 o 960.....	166
MGIT con antibióticos para lectura visual con lámpara UV.....	172
Modelos de registros.....	175

PREFACIO

La emergencia de la resistencia a los fármacos usados para tratar la tuberculosis y muy especialmente de la multirresistencia, ha llegado a ser un problema de salud pública importante y, en algunos países, un obstáculo para el control de la enfermedad.

Se puede prevenir y controlar la tuberculosis resistente a los fármacos sólo si los pacientes infecciosos son diagnosticados y curados sin demora. Un paciente con tuberculosis resistente no tratado o inapropiadamente tratado es una fuente de transmisión de bacilos resistentes lo que a su vez, genera un aumento de los costos de tratamiento y de la mortalidad.

Para identificar, tratar adecuadamente, conocer la situación y orientar el manejo programático de la tuberculosis resistente a los fármacos es indispensable el apoyo de la red de laboratorios de tuberculosis. Esta red es responsable de realizar la prueba de sensibilidad rápida, el cultivo, la identificación y la caracterización del perfil completo de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*. Para que la respuesta sea adecuada, la red debe tener capacidad para realizar pruebas de sensibilidad para todos los casos en los que sea posible la confirmación bacteriológica, garantizando los resultados confiables en forma oportuna.

Esta actualización de esta Guía tiene el propósito de facilitar el incremento de la oferta de la prueba de sensibilidad de *M. tuberculosis*, y la aceleración de sus resultados, mediante la incorporación de algoritmos de trabajo, la sistematización de los procedimientos técnicos y la innovación de los métodos microbiológicos, contemplando la bioseguridad y calidad requeridas. Está dedicada a laboratorios que previamente hayan asegurado competencia, calidad y bioseguridad para realizar baciloscopia y, en el caso en se realicen pruebas de sensibilidad convencionales, también para el cultivo. De manera que esta tercera parte de la Guía de Bacteriología de la Tuberculosis presenta procedimientos que son adicionales a los descritos en las Partes 1 (Baciloscopia) y 2 (Cultivo).

Para la redacción de esta Guía se han tomado en cuenta las normas que lo antecedieron, principalmente las empleadas en Latinoamérica, y el desarrollo tecnológico alcanzado posteriormente, hasta el momento de su redacción. En relación con temas controvertidos o desarrollos recientes, se ha priorizado la consideración de la evidencia publicada. Sin embargo, cuando la literatura resultó limitada, se consideró la opinión de los Laboratorios Supranacionales y expertos de la Región.

DEFINICIONES

Área de contención de riesgo biológico	Uno o más laboratorios que cumplen con los requisitos de bioseguridad definidos por OMS para manipular cultivos vivos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
Aislamiento	Cultivo positivo de bacilos ácido-alcohol resistentes.
Agitar en vortex	Agitar con agitador que genera efecto remolino en la solución o suspensión, para homogeneizarla vigorosamente
Amplicón	Producto de la réplica o amplificación de ácidos nucleicos.
Blanco	Sitio de acción o diana de un antibiótico.
Borderline	Término en inglés empleado frecuentemente para calificar a los resultados de una prueba de laboratorio que se ubican cerca del valor límite definido para clasificar los resultados o en positivo / negativo, o sensible/ resistente.
Cepa salvaje	Cepa nunca expuesta a una droga determinada
Clon	Bacilos genéticamente idénticos entre si que descienden, por multiplicación, de un único bacilo, y forman una colonia en un medio de cultivo
Concentración crítica	Menor concentración de droga que inhibe al 95% de cepas salvajes de <i>M. tuberculosis</i> pero que, al mismo tiempo, no inhibe a las que han sido aisladas de pacientes que no responden a la terapia y que son consideradas resistentes
Concentración inhibitoria mínima	Menor concentración de droga que inhibe al 99% de desarrollo del aislamiento investigado
Disgónico	Con desarrollo pobre, demorado, apenas visible
Eugónico	Con desarrollo vital, bien visible en los tiempos esperados, aun cuando sea con escasas colonias
Extensamente resistente	Resistente al menos a rifampicina, isoniacida, una quinolona y uno de los siguientes inyectables: kanamicina, amicacina o capreomicina
LiPA	Sistema de amplificación de ácidos nucleicos e hibridación en tiras con sondas inmovilizadas (por las siglas del nombre en inglés <i>line probe assay</i>)
Material "limpio"	Sin agentes patógenos o potencialmente infecciosos
Material "sucio"	Con (sospecha de) agentes patógenos o potencialmente infecciosos

MGIT	Tubo de medio líquido con indicador de crecimiento (por sus siglas en inglés <i>Mycobacterial growth indicator</i>)
Multidrogorresistente	Resistente al menos a rifampicina e isoniacida
Pansensible	Sensible a todos los fármacos antituberculosos
Parámetros que indican la precisión de una prueba de sensibilidad	<p>Sensibilidad: precisión para identificar correctamente los aislamientos resistentes (verdaderos resistentes entre todos los resistentes identificados por la prueba, expresado en porcentaje)</p> <p>Especificidad: precisión para identificar correctamente los aislamientos sensibles (verdaderos sensibles entre todos los sensibles identificados por la prueba, expresado en porcentaje)</p> <p>Eficiencia: precisión para identificar correctamente aislamientos sensibles y resistentes (verdaderos resistentes + verdaderos sensibles entre todos los investigados mediante la prueba, expresado en porcentaje)</p>
Primer	Secuencia corta de ácido nucleicos que tiene pares de bases complementarios a una hebra molde a copiar o amplificar, y que actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos (por su nombre en inglés de uso frecuente para nombrar un cebador o iniciador).
Primocultivo	Aislamiento obtenido inmediatamente después de sembrar una muestra de origen clínico (sin repique intermedio)
Prodroga	Fármaco que se administra en forma inactiva o poco activa y que, al ser metabolizado in vivo, se activa
Proporción crítica	Porcentaje de mutantes resistentes en un inóculo estandarizado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , que puede crecer en un medio de cultivo conteniendo la concentración crítica de una droga, por encima del cual la cepa es clasificada como resistente y por debajo del cual es clasificada como sensible. Normalmente es 1%
Resistencia cruzada	Resistencia a dos o más antibióticos que comparten al menos un mecanismo de activación o acción
Sonda	Fragmento de ácido nucleico de pequeño tamaño usado como herramienta para reconocer la presencia de ADN o ARN de secuencia complementaria. Para visualizar este reconocimiento, la sonda puede ser marcada con algún reactivo que emite señal, generalmente cromógena o fluorescente

SIGLAS Y ABREVIATURAS

A	amicacina
ACRB	área de contención de riesgo biológico
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
BAAR	bacilos ácido alcohol resistentes
BK	baciloscopia
C	capreomicina
CIM	concentración inhibitoria mínima
c.s.p.	cantidad suficiente para (indica que la cantidad necesaria de líquido a agregar hasta completar el volumen indicado)
E	etambutol
FQN	fluoroquinolona
I	isoniacida
K	kanamicina
Lfx	levofloxacina
LJ	medio de Löwenstein Jensen
LiPA	siglas del nombre en inglés <i>line probe assay</i>
LRN	laboratorio de referencia nacional
Mfx	moxifloxacina
MGIT	iniciales del nombre en inglés <i>Mycobacterial Growth Indicator Tube</i>
MDR	multidrogorresistente/ multidrogorresistencia
PAS	ácido p-amino salicílico
PCR	iniciales del nombre en inglés <i>polimerase chain reaction</i> , reacción en cadena con polimerasa para la amplificación de ácidos nucleicos
PNB	ácido p-nitrobenzoico o ácido 4-nitrobenzoico
POE	procedimiento operativo estándar
PS	prueba de sensibilidad
R	rifampicina
RR	resistente a rifampicina /resistencia a rifampicina
S	estreptomicina
TB	tuberculosis
TCH	hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico
UFC	unidades formadoras de colonias
XDR	extensamente resistente
Z	pirazinamida

FUNDAMENTOS Y UTILIDAD DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

El tratamiento de la tuberculosis y la generación de resistencia

Con pocas excepciones, los antibióticos de amplio espectro no son efectivos frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Algunas características de este microorganismo explican esa resistencia natural. Su pared muy hidrofóbica impide la penetración de drogas. Además, es difícil que los antibióticos que actúan sobre el metabolismo, síntesis o multiplicación de los gérmenes encuentren su blanco en este bacilo que se multiplica muy lentamente y es capaz de persistir en estado durmiente dentro de los macrófagos, en condiciones de microaerofilia. Además, el bacilo prefiere alojarse en ciertos compartimentos del hospedador (cavernas pulmonares, empiemas, material caseoso sólido) donde la llegada de los antibióticos está dificultada y su acción está muy limitada por el pH muy bajo.

Por eso, fue muy difícil conformar un esquema terapéutico efectivo para la TB. Fueron necesarios más de 20 años de experimentación para producir sólida información que indicaba que combinando los antibióticos más activos descubiertos era posible curar a más del 95% de los pacientes, en un período de 6 meses, con mínimas recaídas. Los antibióticos que hoy integran el tratamiento antituberculosis óptimo estandarizado y utilizado internacionalmente son: I, R, Z, y E. Estos fármacos son combinados durante una primera fase intensiva de aproximadamente 2 meses y, luego, se completa el tratamiento durante otros 4 meses con I R.

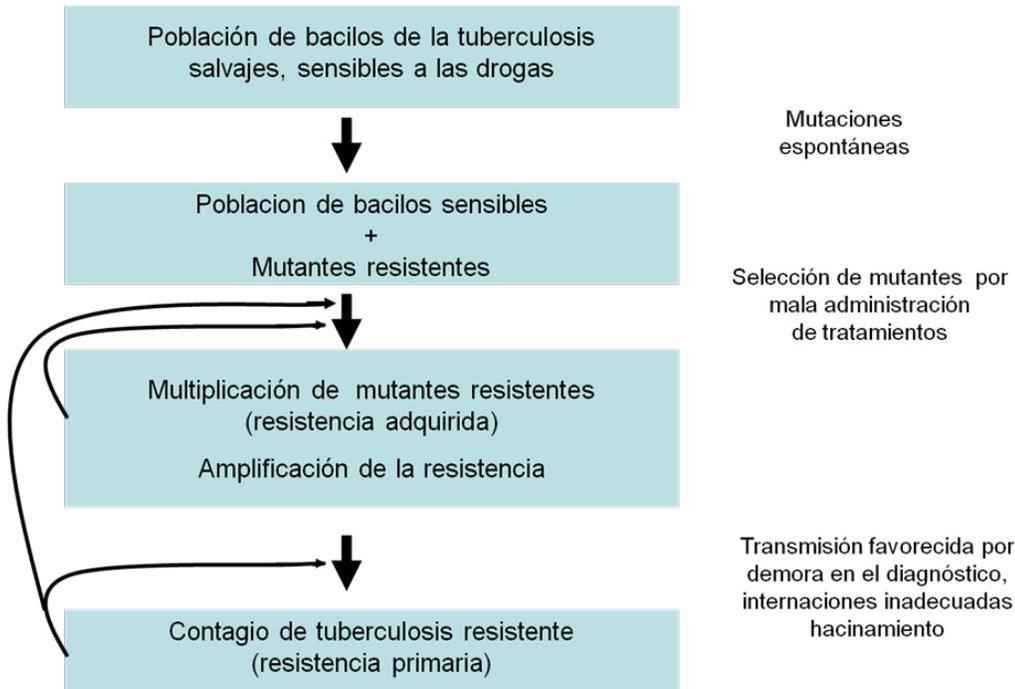
Cuando el bacilo se multiplica, naturalmente pueden aparecer mutantes resistentes a estos antibióticos. Si los esquemas terapéuticos son mal prescriptos (administrando drogas o combinaciones de drogas no adecuadas), o si no son cumplidos en forma regular o completa, puede matarse la población de bacilos sensibles pero no a la resistente que continúa multiplicándose. El tratamiento de primera línea tiene alta probabilidad de fracasar cuando se seleccionan mutantes del bacilo que son RR, y es mayor la probabilidad de fracaso si esos mutantes son simultáneamente resistentes a I y R, es decir MDR. Frente a otro tipo de resistencia en la que no estén involucradas ni la I ni la R, el tratamiento estándar de primera línea aún tiene alta potencia para curar al paciente.

Por estas razones, se recomienda enfáticamente aplicar esquemas estandarizados de demostrada eficacia, supervisar directamente que el paciente tome los medicamentos con regularidad, hasta completarlo. Además, se recomienda no internar un caso con TB a menos que sea indispensable. Si la hospitalización es necesaria, debe ser realizada en aislamiento, en salas adecuadas para evitar que se disemine la infección por vía respiratoria.

Un paciente que tiene diagnóstico de TB realizado mediante BK, y que está afectado por una cepa del bacilo que no es resistente a los fármacos claves para el éxito terapéutico, comienza a responder al tratamiento de primera línea. Esto se evidencia por la disminución del grado de positividad de la BK hasta que, al finalizar el segundo a cuarto mes de tratamiento, la BK se hace negativa. La mayor parte de los casos lo hacen al finalizar el segundo mes. Si la BK persiste positiva en ese momento, es conveniente realizar un cultivo para verificar si la cepa del bacilo que afecta al paciente está viable y una PS rápida para saber si es resistente o no, anticipándose a una posible falla de tratamiento. Para fines programáticos, la falla de tratamiento recién es diagnosticada cuando la BK persiste o vuelve a ser positiva al finalizar el cuarto mes, o posteriormente.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Aparición y amplificación de la resistencia a los fármacos antituberculosos.



Los casos con mayor riesgo de padecer TB resistente a las drogas son los fracasos y los contactos de casos con TB resistente. Luego le siguen los casos recuperados después de pérdida de seguimiento y las recaídas.

Cuando se diagnostica TB MDR o fracaso del esquema de primera línea por resistencia a los fármacos, se conforman esquemas con antibióticos con actividad contra el bacilo mutante. Se combinan drogas tales como las FQN (Mfx, Lvx), inyectables (K, A, C, eventualmente S), etionamida, PAS, cicloserina y otras de más reciente desarrollo. La persistencia en el mal empleo de los fármacos durante el retratamiento puede llevar a que se sume a la MDR, la resistencia a otras drogas que son pivotes para el tratamiento de la TB MDR, como lo son las FQN y aminoglucósidos o C. Se está entonces frente a la denominada TB XDR que tiene peor pronóstico aún.

Mecanismos de acción de los fármacos y de resistencia del bacilo

Aunque el bacilo se multiplica y evoluciona muy lentamente, se adapta rápidamente frente a los antibióticos. Como se ha dicho, cuando está activo y se multiplica, naturalmente aparecen mutaciones en su ADN que, generalmente, son cambios puntuales de alguna base. Algunas de esas mutaciones pueden conferirle resistencia a los fármacos, porque originan cambios en la composición o conformación de las proteínas a las que los antibióticos se unen. Estas proteínas son normalmente enzimas que activan a los fármacos o enzimas que intervienen en algún proceso biológico vital del bacilo. Otras veces la mutación origina la sobre-expresión de algún gen que compensa el daño hecho por el fármaco o rige algún mecanismo que pueda expulsar el antibiótico, como una bomba de eflujo.

El efecto de las mutaciones es muy variable. Algunas mutaciones originan resistencia que se manifiesta aun con baja concentración del antibiótico, otras pueden generar resistencia también a alta concentración. A la vez, la resistencia puede ser cruzada para varios fármacos o no. Por otra parte, la resistencia generada por una mutación puede ser potenciada o anulada por otra(s) mutación(es). Finalmente, no todas las mutaciones en los genes relacionados con la actividad de los fármacos generan resistencia. La comprensión de estos sucesos biológicos es necesaria para interpretar adecuadamente los hallazgos del laboratorio.

La siguiente tabla resume, de forma muy general, los principales mecanismos de acción y resistencia para cada fármaco, y los métodos aceptados para realizar la PS hasta el momento de redacción de esta Guía Técnica. Cabe aclarar que han sido menos investigados los fármacos no considerados esenciales (como cicloserina, tiacetazona, clofazimina y PAS) y aquéllos recientemente desarrollados y/o empleados para el tratamiento de la TB (bedaquilina, delamanid, β -lactámicos). En todos los casos existen mecanismos aun no conocidos.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Fármaco	CIM frente al bacilo sensible µg/ml	Principal proceso biológico del bacilo que afecta	Mecanismos más frecuentemente involucrados en la resistencia					Prueba de sensibilidad		
			gen	molécula que codifica		efecto de la mutación (a)	mutaciones conspicuas	implicancia conocida	Fenotípica	Genotípica comercial
Isoniacida	0,02-0,2	síntesis de pared	<i>katG</i>	catalasa-peroxidasa	activadora de I	1	S315T	alto nivel de resistencia (CIM.>1mg/l), afecta sólo a I mas frecuente en TBMDR; y , cuando no está asociada a RR, es predictora de TBMDR	reproducible predice actividad de la droga en el tratamiento	disponible para las mutaciones más frecuentes
Etonamida	2,5-10		<i>inhA</i>	reductasa	blanco de I y etonamida	2		bajo nivel de resistencia a I (CIM <1mg/l), afecta a I y etio/protonamida más frecuente en TB mono-resistente a I	menos reproducible	
Tiacetazona	0,1-0,5		<i>ethA</i>	activadora de etonamida y tiacetazona		1		afecta resistencia a etio/protonamida y tiacetazona	con valor clínico incierto	no disponible
			<i>operon hadABC</i>	blanco de la droga		1		afecta a etio/protonamida		
Rifampicina	0,05-1	síntesis de ARN	<i>rpo β</i>	ARN polimerasa	blanco de la droga	1	S531L y H526Y/D	mas prevalente alto nivel de resistencia a todas las rifamicinas	reproducible predice actividad de la droga en el tratamiento El equipo MGIT falla con frecuencia en detectar bajo nivel de resistencia	disponible alta sensibilidad y especificidad
							H526L	bajo nivel de resistencia a R puede no ser detectada por métodos fenotípicos		
							L533	bajo nivel de resistencia a todas las rifamicinas		
							D516	afecta a R y mucho menos a rifabutina		
Quinolonas	0,5-2,5	conformación de ADN	<i>gyrA</i>	ADN girasa	blancos de la droga	1	D94G	alto nivel de resistencia a todas las FQN	reproducible	alta sensibilidad requiere ser complementada con prueba fenotípica frente a cada quinolona en uso para dilucidar resistencia cruzada
			<i>gyrB</i>	ADN isomerasa						
Inyectables Estreptomina Kanamicina Amicacina Capreomicina	2-8	síntesis de proteínas	<i>rrs</i>	proteína ribosomal	blancos de la droga	1	A1401G	alto nivel de resistencia a A y K y bajo nivel a C salvo que se sumen ciertas mutaciones en <i>tlyA</i>	reproducible	alta sensibilidad requiere ser complementada con prueba fenotípica para dilucidar resistencia cruzada
			<i>rpsL</i>	proteína ribosomal						
			<i>eis</i>	promotor				bajo nivel de resistencia a K		

Principales mecanismos de acción y determinantes de resistencia de las drogas antituberculosas.
Características de las pruebas de sensibilidad (continuación)

Fármaco	CIM frente al bacilo sensible µg/ml	Principal proceso biológico del bacilo que afecta	Mecanismos más frecuentemente involucrados en la resistencia					Prueba de sensibilidad		
			gen	molécula que codifica		efecto de la mutación (a)	mutaciones conspicuas	implicancia conocida	Fenotípica	Genotípica comercial
Pirazinamida	16-50 (ph5,5)	energía en la membrana	<i>pncA</i>	pirazina midasa	activadora de la droga	1		<i>M bovis</i> - BCG son naturalmente resistentes	no se ha identificado un método preciso de referencia	
			<i>RpsA</i>	proteína ribosomal	blanco de la droga	1				
Etambutol	1-5	síntesis de pared	<i>embB</i>	transferasa	blanco de la droga	1	M306Mut	bajo o moderado nivel de resistencia	menos reproducible que las pruebas a I y R	precisión insuficiente
Cicloserina	≤ 16	síntesis de pared	<i>alr</i>	racemasa	blanco de la droga	2		BCG es naturalmente resistente	reproducible en LJ no en medio líquido ni agar	no disponible
Linezolid	0,5-8	síntesis de proteínas	<i>rpIC</i>	proteína ribosomal	blanco de la droga	1	T460C		poco estandarizada insuficientemente evaluada	no disponible
Clofazimina	≤ 1	liberación de compuestos oxigenados y disrupción de membrana	<i>Rv0678</i>	bomba de flujo	blanco de la droga	2		resistencia cruzada con bedaquilina	no estandarizada	no disponible
Bedaquilina		generación de energía	<i>atpE</i>	ATP sintetasa	blanco de la droga	1			no estandarizada	no disponible
			<i>Rv0678</i>	bomba flujo		3		resistencia cruzada con clofazimina		
Delamanid	≤ 0,05	síntesis de pared	<i>ddn</i> <i>FbiA</i> <i>Fgd1</i>	actividad de nitroreductasa	activadora de la droga	1			no estandarizada	no disponible
PAS		síntesis de ácido fólico captación de hierro	<i>thyA</i>	sintetasas	blancos de la droga	1			estandarizada reproducibilidad insuficientemente evaluada	no disponible
			<i>folC</i>			1				
β-lactámicos amoxicilina, meropenem		disrupción de pared							no estandarizada	no disponible

(a) 1 inhibe la unión de la droga con el blanco 2 sobre-expresión de un mecanismo que compensa el daño de la droga 3 sobre-expresión de un sistema de expulsión (bomba de flujo)

Nominación de mutaciones. Ejemplo S531L serina ha sido reemplazada por leucina en la posición 531

Fármacos para los que puede ocurrir resistencia cruzada.

Isoniacida, etionamida/protionamida, tioacetazona

Las tres son prodrogas. Para que sean efectivas, deben ser activadas por enzimas del bacilo que también actúan en la degradación de compuestos superoxigenados producidos por los macrófagos del hombre como respuesta a la infección. Una vez activadas, estas drogas atacan enzimas del bacilo que intervienen en distintas etapas de la síntesis de los ácidos micólicos los que, a su vez, son componentes esenciales de la pared del bacilo. También pueden afectar otros procesos biológicos. En particular la I, que tiene una estructura muy simple, es uno de los antibióticos más complejos por su mecanismo de acción; su potencia se debe seguramente al efecto sobre múltiples blancos. Es activa contra los bacilos que se multiplican activamente en las cavernas pulmonares. Es bactericida a muy baja concentración y en etapas tempranas de la enfermedad. Por eso reduce rápidamente el número de bacilos vivos en el esputo del paciente y por lo tanto el riesgo de contagio.

La I es activada por la catalasa (*katG*) y ataca primordialmente dos enzimas que intervienen en la reducción (*kasA*) y elongación (*inhA*) de los ácidos micólicos. Además, interfieren la formación del ADN y también podría afectar el NAD y, por lo tanto, la producción de energía. Ciertas mutaciones que ocurren en *katG* hacen al bacilo resistente a I porque no puede activarla con eficiencia. También puede hacerse resistente por alguna mutación en los genes que codifican las enzimas blanco de la droga, principalmente *inhA*. Lo más frecuente es que las mutaciones ocurran en regiones muy acotadas de esos genes. Las mutaciones en *katG* son las más prevalentes, generan alto nivel de resistencia, y están asociadas a TB MDR. En cambio, las mutaciones en *inhA* generan bajo nivel de resistencia a I, confieren resistencia también a etio/protionamida, y son relativamente más frecuentes en aislamientos mono-resistentes a I. Más raramente, ocurren otras mutaciones fuera de esas regiones o en otros

genes, incluso en algunos aún no identificados. Por otra parte, la etio/protionamida y la tiacetazona son activadas por una misma enzima (*ethA*). Una vez activada, la tiacetazona inhibe una vía de la transformación de los ácidos micólicos mediada por metiltransferasas (*mmaA*) y por el operón *hadABC*, ambos involucrados en la resistencia a esa droga.

En suma, la I y etionamida son activadas por distintas moléculas, pero tienen un blanco en común. La etio/protionamida y la tiacetazona son activadas por una misma enzima pero tienen distintos blancos. De manera que puede ocurrir resistencia cruzada entre I y etio/protionamida y entre etio/protionamida y tiacetazona, según las mutaciones que aparezcan afectando los activadores o blancos los fármacos.

Rifamicinas (rifampicina, rifabutina)

Por ser lipofílicas penetran rápidamente a través de la envoltura del bacilo e interfieren la síntesis de ARN mensajero, uniéndose a la polimerasa codificada por el gen *rpoβ*. La R es bactericida y actúa aún sobre bacilos que están metabolizando lentamente, mata a los persistentes y termina de esterilizar el esputo de los pacientes.

En cerca del 95% de los aislamientos que son resistentes a R está mutado el gen *rpoβ* en una pequeña región. Sólo 3 mutaciones se encuentran en más del 70% de los aislamientos resistentes, y una de ellas (S351L) es la más frecuente globalmente. Estas mutaciones confieren alto nivel de resistencia, elevando mucho la CIM, y resistencia cruzada con otras rifamicinas. Algunas mutaciones, menos frecuentes, confieren bajo nivel de resistencia a R que, con cierta frecuencia, no es detectada por las PS convencionales, especialmente las realizadas con el sistema MGIT, pero que también fueron asociadas a ineffectividad del fármaco en el esquema terapéutico.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Fluoroquinolonas

Inactivan enzimas responsables de la conformación del ADN del bacilo. La resistencia se asocia principalmente a mutaciones puntuales en los genes que codifican la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*). Las más prevalentes se presentan en una pequeña fracción del primero de ellos. Otros mecanismos son menos frecuentes y parecen conferir bajo nivel de resistencia. En general, las mutaciones múltiples en uno o ambos genes elevan el nivel de resistencia. Pero también se ha demostrado que cierta mutación puede anular el efecto de otra(s) y hacer el aislamiento sea hipersensible.

Existe resistencia cruzada entre las FQN de vieja y reciente generación (como la originada por la mutación D94G en *gyrA*). Pero el conocimiento acerca de este fenómeno es incompleto por lo que el patrón es difícil de predecir.

Inyectables: aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina, ampicilina) y capreomicina

Los aminoglucósidos y la C, que es un polipéptido cíclico, se unen a distintas subunidades del ribosoma y originan la lectura defectuosa del ARN afectando la síntesis de proteínas. Ciertos cambios en la secuencia o conformación del ARN o de las proteínas ribosomales (*rpsL*, *rrs*, *gidB*, *tly A*, *eis*) generan resistencia alta, moderada o baja del bacilo a una o más de estas drogas. Pareciera que ciertas mutaciones en *rrs* están asociadas a resistencia cruzada, que otras en el gen *eis* son buenos marcadores de resistencia a K y algunas en *tly A* se encuentran preferentemente entre los aislamientos resistentes a C. De todas formas, en los bacilos puede ocurrir una o múltiples mutaciones que confieren resistencia a una o más de estos fármacos, con un patrón que es difícil predecir.

Bedaquilina y clofazimina

La clofazimina afecta una fosfolipasa y ciertos transportadores de potasio de la membrana del bacilo. También podría bloquear la cadena respiratoria, dando lugar a la liberación de compuestos que provocan en el bacilo estrés oxidativo.

La bedaquilina inhibe la ATP sintetasa codificada, en parte, por el gen *atpE* que rige la generación de la energía que requiere el bacilo. Ciertas mutaciones en este gen han sido identificadas como causa de resistencia.

Ambos fármacos tienen blancos diferentes, pero se han identificado dos mecanismos que confieren bajo nivel de resistencia a clofazimina y resistencia cruzada con bedaquilina. Uno es la sobre-expresión de una bomba de eflujo (Rv0678), y el otro es mediado por mutaciones en el gen *pepQ* cuya función no está bien conocida, probablemente interviene en la hidrólisis de péptidos.

β -lactámicos

Se unen a varias enzimas que intervienen en la síntesis y lisis de la pared del bacilo. *M tuberculosis* es naturalmente resistente a esta clase de antibióticos no sólo porque su pared impide el ingreso sino porque, además, produce β -lactamasas de amplio espectro que los destruyen. Sin embargo, en presencia de inhibidores de β -lactamasas (clavulanato o sulbactam), la sensibilidad de los aislamientos clínicos es variable. *In vitro*, la combinación es efectiva frente a aislamientos MDR y XDR. Ciertas mutaciones en el gen que codifican una β -lactamasa (*BlaC*) podrían conferir hipersensibilidad del bacilo a los β -lactámicos.

Otros fármacos

Pirazinamida

Su introducción en el esquema de primera línea permitió acortar tratamientos que duraban 18 ó 24 meses a 6 meses, y parece ser un pilar para el desarrollo de regímenes acortados para el tratamiento de la TB MDR. Porque actúa a pH ácido, puede matar bacilos semi-durmientes dentro de focos necróticos durante la inflamación activa; no aporta beneficio en la segunda etapa del tratamiento. No es totalmente activa en el medio de cultivo neutro. A pesar de la gran actividad que muestra *in vivo*, *in vitro* tiene una CIM muy alta, aún a pH 5,5 y muestra un efecto bacteriostático lento sobre el bacilo. Se ha propuesto el siguiente mecanismo de acción. La Z entra por difusión pasiva en el bacilo,

es convertida por la pirazinamidasa citoplasmática del microorganismo a ácido pirazinoico que es la molécula activa. El ácido pirazinoico sale del bacilo por difusión pasiva y por un mecanismo de eflujo débil. Afuera, a pH ácido, una pequeña proporción del ácido pirazinoico se transforma en un conjugado ácido, sin carga, vuelve a atravesar la membrana del bacilo fácilmente y se acumula en el citoplasma. Al entrar, introduce protones que podrían acidificar el citoplasma del bacilo e inhibir a enzimas vitales. También podría quitarle energía a la membrana y afectar el transporte de sustancias a través de ella. La Z tiene varias similitudes con la I: ataca múltiples blancos, es una prodroga que requiere una transformación para ser droga activa, y es muy específica para el bacilo de la TB. Otras bacterias, incluyendo otras micobacterias entre las que está *M. bovis* y su variante BCG, no son sensibles porque tienen débil o nula actividad de pirazinamidasa o sistemas de eflujo que expulsan la droga. Se han identificado diversas mutaciones en el gen de la pirazinamidasa (*pncA*) y en su promotor como mecanismo de resistencia. El ácido pirazinoico se une con mucha afinidad a la proteína ribosomal S1 (*RpsA*) la que también podría estar involucrada entre los mecanismos de resistencia, junto con otros poco conocidos o desconocidos.

Etambutol

Es bacteriostático. Actúa sobre el bacilo que está multiplicándose, en la biosíntesis de arabinogalactano, el principal polisacárido de la pared de las micobacterias. Inhibe la polimerización de intermediarios que se acumulan. El blanco puede estar en varias arabinosil transferasas codificadas por el operón *emb*. Ciertas mutaciones en *embB* de *M. tuberculosis* presentes en la mayoría de los aislamientos resistentes confieren alto nivel de resistencia, mientras que en aislamientos menos frecuentes con bajo nivel de resistencia no se encuentran mutaciones en ese gen, lo que sugiere que existen otros mecanismos de resistencia. Algunos mutantes resistentes tienen pared celular defectuosa, lo que podría dar sustento a la administración de E en el tratamiento de afecciones causadas por algunas micobacterias que in vitro se muestran resistentes a él.

PAS

Su mecanismo de acción no es bien conocido. Se postula que, como las sulfonamidas, compite con el ácido p-aminobenzoico o que interfiere en la biosíntesis de micobactinas (proteínas de las micobacterias que transportan el hierro hacia el interior de la bacteria) lo que explicaría su reducido espectro de acción. Las mutaciones que ocurren en los genes involucrados en estos procesos parecen no ser los únicos mecanismos de resistencia.

Cicloserina

Bloquea la síntesis de peptido-glicanos compitiendo con la D-alanina por la D-alanina racemasa (*alr*) y la d-alanyl-d-alanina sintetasa (d-alanina ligasa) (*ddlA*). En los clones resistentes se encontró una mutación puntual en el promotor de *alrA* que lleva a la sobreproducción de la enzima.

En el momento de redactar estas guías se investigan 4 clases de medicamentos que no habían sido utilizados antes para tratar TB (diarylquinolinas como la ya mencionada bedaquilina, derivados de nitroimidazol como delamanida y petromanida, etilen-diaminas, y oxazolidinonas como el linezolid). Aún es incipiente el conocimiento acerca de los mecanismos de resistencia que ocurren frente a estos fármacos.

Probabilidad de aparición de mutantes resistentes

Es muy poco probable que los pacientes vírgenes de tratamiento antituberculosis estén afectados por cepas del bacilo resistentes, excepto que se hayan contagiado de algún caso con TB resistente a los fármacos, lo que puede ser sospechado cuando se conoce el contacto. Como ya se ha mencionado, entre los pacientes con historia de tratamiento previo, son los fracasos los que tienen mayor probabilidad de estar afectados por bacilos resistentes.

Dado que las mutaciones aparecen a medida que se multiplica el bacilo, cuanto más se ha reproducido mayor es la posibilidad de que aparezcan o se sumen mutantes resistentes. Por eso son más frecuentes en lesiones pulmonares muy avanzadas y en las

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

adenopatías que se caracterizan por contener un alto número de bacilos. Por el contrario, son raros en lesiones poco avanzadas y en la mayor parte de las TB extrapulmonares. Este principio explica por qué se indica profilaxis con un solo fármaco (I) para prevenir el avance de infecciones latentes, y por qué las irregularidades en la primera etapa del tratamiento pueden llevar peligrosamente a seleccionar mutantes resistentes, mientras que las que ocurren más tarde difícilmente lo hagan.

Las mutaciones que menos reducen la aptitud del bacilo para sobrevivir y multiplicarse, o las que están favorecidas por otros factores biológicos, pueden predominar.

Es más probable que aparezcan mutantes resistentes a I que a R. Por eso, bajo la presión de selección de estas drogas, generalmente primero aparece la resistencia a I y luego a R. Dicho de otra forma, la mayoría (más del 90%) de bacilos resistentes a R ya son resistentes a I, o sea MDR. Entonces la RR es marcadora de MDR y su detección rápida tiene gran utilidad porque permite advertir sobre la necesidad de rediseñar el esquema terapéutico.

La frecuencia con la que aparece la resistencia a otros fármacos es mayor entre aislamientos que ya se han hecho MDR, y más aún entre los XDR. Esto fue demostrado para Z, linezolid, clofazimina y seguramente tiene relación con el empleo de los fármacos en estos casos.

En general la frecuencia relativa de las distintas mutaciones es similar en el mundo. Aun así, la prevalencia de ciertas mutaciones particulares podría variar en distintas regiones geográficas, y en distintos linajes del bacilo. Esto podría limitar la sensibilidad de las pruebas moleculares en algunos escenarios especiales.

Indicación y utilidad de la prueba de sensibilidad de Mycobacterium tuberculosis.

Las detección de resistencia a R y/o I permite

- *identificar casos con TB MR o con alto riesgo de TBMR que requieren readecuación del régimen terapéutico para mejorar su pronóstico*
- *salvar vidas de pacientes*
- *interrumpir la transmisión de cepas del bacilo que originan una forma de la enfermedad difícil de curar*

Por eso es necesario realizar la PS temprana y rápidamente cuando se identifican pacientes con riesgo elevado de padecer TB resistente a las drogas

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

- falla de tratamiento
- antecedentes de tratamiento previo, irregularidad en el cumplimiento de un tratamiento o prescripción de un esquema incompleto o inadecuado
- exposición a infección por TB resistente a los fármacos, especialmente en hacinamiento, en:
 - centros de salud, prisiones u otras instituciones donde se han registrado esos casos, particularmente si las personas expuestas son inmunocomprometidas o trabajadores de esas instituciones
 - el domicilio, ámbito laboral o social
 - en un área geográfica con alto nivel de resistencia a los fármacos antituberculosis.

Entre los casos con antecedentes de tratamiento, los clasificados como fracasos y crónicos tienen mayor posibilidad de estar afectados por cepas del bacilo resistentes a los fármacos. Además podrían identificarse otros casos con riesgo incrementado, tales como los tratados por algún componente del sistema de salud que administra tratamientos en forma inadecuada.

Los pacientes infectados por HIV son particularmente vulnerables a infecciones hospitalarias, y están especialmente expuestos a TB cuando son atendidos en hospitales de referencia, que también concentran la asistencia de la TB. La situación es más grave aun cuando en esos hospitales atienden casos con TB resistente a los fármacos y cuando las medidas de control de infecciones no son efectivas.

En países con baja prevalencia de resistencia pueden definirse como grupos expuestos a los inmigrantes de países con alta tasa de resistencia o, en ausencia de esta información, de países con programas que operan pobremente (con deficiencias en la supervisión del tratamiento, en el mantenimiento de los stocks de medicamentos o en su administración).

Como medida preventiva es beneficioso incluir entre los grupos priorizados para el conocimiento del perfil de sensibilidad a los siguientes casos:

- pacientes bajo tratamiento que demoran en negativizar la BK, aun cuando es posible que evolucionen favorablemente,
- los que no toleran alguno o varios fármacos de primera línea, por si es necesario recurrir a esquemas diferentes del estandarizado,
- pacientes que pueden tener una evolución muy tórpida ante una eventual falla de tratamiento (ej. inmunocomprometidos).

El laboratorio de referencia y la conducción del Programa Nacional de Control de TB deben consensuar y difundir las normas que rijan la oferta de las PS, y diseñar e implementar formularios adecuados para la solicitud de estudios

bacteriológicos. Las normas y herramientas para la recolección de información deben identificar claramente los grupos de riesgo de TB resistente, las drogas que deben ser ensayadas, según los esquemas terapéuticos estandarizados, la confiabilidad que tengan los métodos adoptados para la PS y los niveles de resistencia registrados.

Si se detecta TB RR o MDR, es necesario conocer la sensibilidad al resto de los fármacos de primera y segunda línea.

Hasta alcanzar la meta de realizar la PS a drogas antituberculosis pr todos los casos confirmados microbiológicamente, las siguientes son las prioridades

- **En el momento de diagnóstico de pacientes**
 - *con antecedentes de tratamiento con el siguiente orden en relación con el riesgo: fracasos, recuperados luego de pérdida de seguimiento, recaídas*
 - *contactos de casos con TB resistente a las drogas (convivientes domiciliarios, internados o trabajadores de instituciones de salud o de prisiones donde se registran casos con TB MR)*
 - *inmunocomprometidos (VIH positivos y diabéticos)*
 - *con intorelacia a las drogas antituberculosas*
- **Durante el control de tratamiento de casos de TB**
 - *con BK de esputo positiva al finalizar el segundo mes de tratamiento o posteriormente*
 - *diagnosticados con BK negativa y que convierten a positivo su BK*
 - *con mala adherencia al tratamiento*

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

El conocimiento y registro de los perfiles de sensibilidad a los fármacos antituberculosis de los casos diagnosticados permite, además, mantener bajo vigilancia permanente el nivel de resistencia.

Principios de los métodos

El resultado de la PS no debe ser informado si previamente no se ha identificado al aislamiento investigado como *M. tuberculosis*

Si se trata de otra micobacteria no identificada apropiadamente el error es grave para el paciente

Otras micobacterias pueden no requerir tratamiento alguno (en caso de que fueran contaminantes o comensales banales) o requerir un tratamiento muy diferente a empleado para TB (en el caso en que estuvieran causando patología)

Para no demorar la realización de la PS, o su informe, se requiere un método rápido de identificación molecular, o la detección de antígenos propios de *M. tuberculosis* que puede ser realizado muy simplemente por inmunocromatografía lateral.

Métodos que investigan el crecimiento del bacilo en medios con antibióticos (fenotípicos)

Para conocer si los fármacos son activos frente a los bacilos presentes en una muestra clínica, se la cultiva en medios que contienen cada una de las drogas que se desea ensayar, por separado, y se observa si los bacilos desarrollan o no luego de que han sido expuestos a la acción de los antibióticos (fenotipo resistente o sensible respectivamente). Siempre es necesario cultivarlo también en medio sin droga, como control de la viabilidad y pureza del germen y para poder comparar el desarrollo que presenta con y sin exposición a la droga.

No son útiles las PS comúnmente empleadas para otras bacterias en medios sólidos, como los que usan discos o tiras impregnados con antibióticos que difunden sobre el medio de cultivo. Por el lento desarrollo del bacilo, la necesidad de estimar con precisión la proporción de clones del bacilo que resisten la acción de las drogas y el riesgo biológico que implica su manipulación en el laboratorio, fue necesario diseñar pruebas peculiares que no son realizadas normalmente en un laboratorio de microbiología general.

La población de bacilos con los que se trabaja debe estar multiplicándose activamente para obtener resultados confiables, es decir que no es recomendable trabajar con cultivos envejecidos.

La acción del antibiótico sobre los bacilos ocurre en las primeras horas y días de contacto. Sin embargo, se requiere incubación prolongada para que sea visible el desarrollo o falta de desarrollo con cada droga ensayada, evidenciando así si el bacilo la ha resistido o no.

Tanto en medio sólido como líquido es posible incluir varias concentraciones de cada fármaco o diluirlo en forma seriada para determinar su CIM. Pero para la aplicación clínica general, se han simplificado los métodos escogiendo una concentración crítica que permite diferenciar aislamientos de bacilo sensibles de los resistentes, según lo demostrado por exhaustivas investigaciones de Canetti, Rist y Grosset.

Método de las proporciones en medio sólido

El método más utilizado en Latinoamérica es la variante económica y simplificada del método de las proporciones, estandarizado por los mencionados investigadores en medio de LJ, pero también puede ser realizado en agar Middlebrook. Las concentraciones críticas de los antibióticos pueden ser diferentes según el medio de cultivo que se emplee, dependiendo de la inactivación que sufran en ellos. Al estandarizar los métodos se han encontrado concentraciones para cada medio que

permiten reproducir los resultados en todos ellos. Cuando se emplea agar, las placas o tubos pueden ser inspeccionadas con microscopio o lupa para detectar el desarrollo más precozmente.

El método de las proporciones permite contar la cantidad de UFC que crecen en medios. Cuando la cantidad de UFC en el medio con antibiótico supera el 1% de la desarrollada en el control, el aislamiento es considerado resistente. Para que sea posible detectar este límite de resistencia, en el medio sin droga deben haber desarrollado al menos 100 colonias.

El método es laborioso pero muy preciso y continúa siendo considerado el de referencia para dilucidar inconsistencias, indefiniciones o dudas que surgen con los resultados obtenidos con otras pruebas.

Inóculo

Para tener un resultado que evidencie el perfil de sensibilidad de los bacilos que afectan al paciente en el momento en que se hace la investigación, se debe partir de una muestra reciente de esputo o de otro tipo.

Prueba Directa.

Para acelerar el resultado, la PS puede ser realizada directamente a partir de la muestra clínica, si contiene abundantes bacilos, es decir si tiene BK positiva, preferentemente 2+ ó 3+. Con una menor cantidad de bacilos es probable que el desarrollo resulte insuficiente para detectar clones resistentes que puedan estar en baja proporción. La muestra debe ser descontaminada con el procedimiento habitual, si no se trata de un tejido naturalmente estéril. Si se realiza la prueba directa y el desarrollo es insuficiente es necesario repetirla a partir del desarrollo obtenido en el medio sin antibiótico (control), porque los antibióticos seleccionan clones resistentes.

Prueba Indirecta.

Cuando se trabaja a partir de bacilos cultivados, siempre es conveniente partir del primocultivo y no

de repiques, para evitar la selección de clones. Para acelerar los resultados y evitar el envejecimiento del cultivo, se debe disponer la realización de la PS en cuanto se observa desarrollo, aunque las colonias sean todavía pequeñas, a menos que se hayan detectado muy escasas colonias y se presuma que con unos días adicionales de incubación el desarrollo será más abundante. En la parte 2 de este Manual dedicado al Cultivo se ha expresado la idea de que es necesario un número mínimo de colonias desarrolladas en el primocultivo para realizar la PS. Cabe aclarar que esto se aplica cuando se está trabajando con una muestra investigada para diagnóstico y que tiene BK positiva 1+ a 3+. Ese tipo de muestra debe producir un abundante número de colonias si ha sido transportada y cultivada adecuadamente. Sin embargo, los pacientes que tienen lesiones poco avanzadas, extrapulmonares, que son HIV positivos o los niños, y los casos que ya están bajo tratamiento, pueden liberar poca cantidad de bacilos viables en las muestras y, en esos casos, es aconsejable realizar la PS, aunque sea a partir de cultivos con escasas colonias, e informar al médico tratante que el estudio ha sido realizado en estas condiciones. El repique de escasas colonias de un primocultivo para obtener mayor desarrollo no aumenta su representatividad, ya que sólo se están multiplicando los pocos clones inicialmente aislados. Para tener mayor certeza con los resultados de la PS de este tipo de pacientes es aconsejable cultivar 2 ó 3 muestras sucesivas, si esto es posible, y enviar al laboratorio que realiza la PS todos los tubos positivos.

Para preparar el inóculo es necesario tomar la mayor parte de bacilos presente en una muestra o en cultivo, de manera que el resultado sea representativo de la población de bacilos que afecta al paciente. Para ello, se trabaja con todo el precipitado obtenido con una muestra descontaminada ó la masa bacilar tomada de toda la superficie del desarrollo obtenido mediante cultivo. Cuando el desarrollo de un cultivo es escaso, es necesario tomar colonias de todos los tubos con desarrollo con los que se cuente, aun cuando sean de diferentes muestras del paciente sembradas consecutivamente.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Para obtener el desarrollo adecuado para que la PS sea válida, es necesario estandarizar el inóculo y sembrar diluciones adecuadas para contar las UFC. En la variante simplificada de este método, se siembran tres diluciones en el medio sin droga y dos diluciones en los medios que contienen las drogas. Cuando se parte de una muestra descontaminada, se siembran diluciones que son mayores cuanto mayor es el grado positividad de BK de esa muestra. Cuando se parte de un aislamiento, se inicia el procedimiento con una suspensión de bacilos con una opacidad estandarizada, y con ella se hacen diluciones. Para que los cálculos sean válidos, las diluciones deben haber sido realizadas con suspensiones muy homogéneas, con mucha precisión, cambiando pipetas toda vez que se pase de una suspensión concentrada a una más diluida y el volumen sembrado en cada tubo debe ser exactamente igual.

Incubación y lectura

La suspensión de bacilos inoculada en medios sólidos debe quedar distribuida homogéneamente para permitir el conteo preciso de UFC, y por lo tanto los tubos con medios sólidos deben permanecer inclinados hasta que se absorba. La absorción puede demorar 2 a 20 días dependiendo del tipo de tubos y medio que se utilice. Así se evita el repique, o "sobresiembra", al mover los tubos. Este efecto puede llevar a falsas estimaciones de la carga bacilar sembrada.

El método requiere cuantificar el inóculo en el medio control, sin droga. Normalmente, el desarrollo que se obtiene con la suspensión más concentrada sembrada es difícil de cuantificar, porque es abundante. Entonces, conociendo las diluciones realizadas, a partir del número de UFC observadas en los tubos sembrados con suspensiones más diluidas, es posible inferir la cantidad de UFC que se observa con la más concentrada. Luego, se pueden contar las UFC desarrolladas en los tubos de medios con drogas, y calcular si este número supera o no el 1% de la cantidad de bacilos inoculada.

Conviene realizar inspecciones intermedias para comprobar si el desarrollo es suficiente y si no se ha producido contaminación indeseada. Si aparece alguna resistencia, debe ser informada en el momento de esa inspección intermedia. En la mayoría de los casos, la resistencia puede ser detectada dentro de las tres primeras semanas de incubación. En el caso particular de los dos fármacos claves para el éxito del tratamiento antituberculosis, I y R, la resistencia se detecta en más del 95% de los casos en ese plazo. Si no aparece resistencia, se prolonga la incubación hasta el mes o los 40 días, según el medio empleado, para confirmar que la cepa es sensible a las drogas que inhibieron el desarrollo durante las primeras semanas. Esto se hace porque, con poca frecuencia, es posible que aparezcan mutantes resistentes tardíamente.

Condición	Razón
suficiente desarrollo (al menos 100 colonias) en los tubos controles, sin droga, sembrados con una suspensión de bacilos concentrada	para que sea posible detectar mutantes resistentes que estén en ese inóculo en bajo porcentaje, cercano al 1%,
colonias separadas y contables en los tubos controles sembrados con suspensiones más diluidas	para que sea posible inferir, a partir del número contado en estos tubos, el número de colonias desarrollado con la suspensión más concentrada (normalmente difícil de contar o incontable)
Correlación entre el número de colonias desarrolladas con cada una de las suspensiones sembradas, según el factor de dilución aplicado	para que la inferencia del punto anterior sean válida

Para poder interpretar el resultado final de la PS es necesario que los medios empleados sean de buena calidad y que se cumplan simultáneamente tres condiciones:

Prueba de nitrato reductasa

Una alternativa económica para acelerar los resultados de la PS en medio a base de huevos, consiste en agregarle nitrato de sodio o potasio. Luego, es posible revelar tempranamente la actividad de nitrato reductasa que tiene el bacilo por el método de Griess. Se trata de la misma prueba bioquímica que se emplea para identificar al bacilo de la TB y otras micobacterias (ver Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis, Parte 2 Cultivo). Será positiva en el medio con y sin droga, en el caso en que el aislamiento resista al antibiótico, y sólo en el medio sin droga en el caso en que sea sensible.

Idealmente, el método debe ser realizado directamente con muestras con BK positiva recién recolectadas o en cuanto se obtiene desarrollo en el primocultivo. Con muestras o cultivos envejecidos es posible que se deteriore la actividad enzimática y que, por lo tanto, no sea posible obtener resultados interpretables.

Con esta prueba, no es posible contar colonias. Según lo experimentado para obtener alta reproducibilidad con el método de las proporciones convencional, el inóculo debe ser sembrado 10 veces más diluido en el medio sin droga. Se compara luego la intensidad del color de la reacción, y por ende del desarrollo, del medio que contiene droga con el que no la contiene. Si el primero el color es más intenso que en el segundo, se infiere que ha crecido alto porcentaje de bacilos resistentes y por lo tanto que el aislamiento es resistente.

Para determinar el momento en el que la prueba puede ser revelada, se siembra el inóculo en varios tubos control, conteniendo medio sin droga. Periódicamente se agregan las soluciones reveladoras a cada uno de ellos, hasta detectar una reacción positiva evidenciada por la aparición

de color. En ese momento se considera que el desarrollo es suficiente para interpretar los resultados y se revelan los tubos con los antibióticos. La mayor parte de los resultados son obtenidos a las dos semanas de incubación.

Su precisión es muy alta, similar a la de los métodos convencionales, para determinar la sensibilidad a I y R. No es recomendable, en cambio, que sea aplicado para investigar la actividad de otras drogas de primera línea porque la concordancia de resultados es menor.

Adaptación del método de las proporciones en medios líquidos

El empleo de caldos tiene desventajas desde el punto de vista de la bioseguridad, como será discutido más adelante, pero permite acelerar resultados, especialmente cuando se emplean recursos para detectar el desarrollo del bacilo antes de que sea claramente visible. Para esto, los caldos pueden contener algún detector de la viabilidad del bacilo (indicadores de consumo de O₂, de liberación de CO₂ o de actividad redox) que cambian de color o emiten fluorescencia cuando el bacilo desarrolla.

El inóculo también es estandarizado a partir de una muestra homogénea del primocultivo que ha alcanzado un número de UFC suficiente en el caldo como para que el lector emita señal positiva. Lo ideal es hacer la PS rápidamente, de otra forma, además de retrasar los resultados, es necesario adecuar las diluciones, según el tiempo transcurrido desde que se detectó la señal, o realizar un repique previo en el mismo caldo.

En los medios líquidos no es posible contar colonias. Entonces, basándose en el mismo principio del método de las proporciones, se siembra en el medio sin antibiótico el inóculo 100 veces más diluido que en el medio con antibiótico. De esta forma, si se detecta mayor crecimiento en el segundo que en el primero, ha crecido más del 1% de clones resistentes y se determina que el aislamiento del bacilo es resistente al fármaco en cuestión.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Como se ha explicado en el Manual de Cultivo, la industria ha desarrollado equipos que monitorean y comparan periódicamente el desarrollo detectado en el medio con y sin droga. El equipo MGIT 960/320 interrumpe la PS cuando el desarrollo del medio sin droga alcanza el umbral para emitir la señal positiva o, cuando este umbral no se alcanza, al finalizar las dos semanas de incubación. Esta interrupción automática de la prueba es desventajosa para casos de aislamientos disgónicos o que tienen bajo porcentaje de clones resistentes, cercano al 1% establecido como límite, que pueden requerir incubación un poco más prolongada. Cuando se sospecha que se está frente a este tipo de aislamientos, conviene repetir la prueba con el método convencional que permite cuantificar la proporción de la población de bacilos que es resistente. Otro recurso para evitar la interrupción automática de la PS es el empleo de softwares especiales que permiten que el operador tome la decisión del momento en que la da por finalizada.

En los sistemas “caseros”, también se siembra el inóculo más diluido en el medio sin antibiótico que con antibiótico, según se haya estandarizado para obtener resultados coincidentes con los del método convencional de referencia. En estos casos se siembran varios tubos u hoyos de microplacas que contienen medio sin antibiótico, como control. Periódicamente se revela uno de ellos hasta obtener señal positiva. En ese momento el desarrollo es suficiente para poder interpretar la prueba y entonces se procede a revelar el resto de los tubos u hoyos sembrados con antibióticos.

Puntos críticos de la PS realizada en medio de cultivo (fenotípica)

- *La pureza y conservación de los antibióticos*
- *La calidad en la preparación y conservación de los medios de cultivo con antibióticos*
- *La viabilidad de los bacilos que van a ser investigados en la muestra o en el cultivo*
- *La estandarización y homogeneidad del inóculo*
- *La interpretación de resultados*

Prueba de sensibilidad a la pirazinamida

Como se ha dicho, la Z es más activa a pH cercano a 5. A este pH un porcentaje no despreciable de aislamientos de *M. tuberculosis* no desarrolla o lo hace en forma muy disgónica en los medios de cultivo, efecto que es más notorio en los medios a base de huevos. Se ha dicho que los sistemas comerciales que emplean medios líquidos son los de referencia para determinar la sensibilidad a esta droga. Sin embargo, también con ellos se han comunicado resultados falsos o inconsistentes.

Por otro lado, se conoce que las cepas que tienen alto nivel de resistencia a la Z han perdido la actividad de la enzima pirazinamidasa, por mutaciones que aparecen en el gen que la codifica. Es posible distinguir estas cepas investigando si el bacilo tiene la capacidad de actuar sobre la Z y liberar ácido pirazinoico. Esto puede hacerse mediante una prueba bioquímica muy sencilla y económica (método de Wayne). Si el resultado es negativo se infiere que la cepa es resistente a Z.

Aún no es completo el conocimiento sobre la sensibilidad in vitro del bacilo a este fármaco. Existen cepas con bajo nivel de resistencia a la concentración de Z que se emplea en los medios de cultivo, que tienen actividad enzimática. Y hay un porcentaje de aislamientos para los que no se correlacionan los resultados de la prueba molecular con la de sensibilidad realizada en cultivo.

Métodos moleculares

Se aplican para identificar las mutaciones que han sido asociadas a la resistencia a los fármacos. Para esto no es esencial que el bacilo esté multiplicándose o viable, por lo que las condiciones del cultivo o de la muestra a partir de la que se trabaja no son tan críticas.

Para verificar si el bacilo porta alguna de esas mutaciones es posible amplificar y secuenciar el segmento del gen donde se producen. Se utilizan varios juegos de primers que permiten amplificar, por un lado, algún segmento específico de *M.*

tuberculosis para identificar la bacteria, y por otro el segmento del o de los genes donde se concentran las mutaciones asociadas a resistencia a un determinado fármaco. Cada producto amplificado es denominado amplicón, y pueden luego ser secuenciados en un equipo automático. Este es el método más preciso para caracterizar los amplicones porque permite identificar con precisión en ellos las mutaciones producidas y verificar si están asociadas o no a la resistencia al fármaco en cuestión. Si bien el desarrollo tecnológico está haciendo cada vez más accesible a la secuenciación, no solo de amplicones sino también del genoma entero de la bacteria, en el momento de redacción de estas Guías su uso no está generalizado en instituciones dedicadas a la detección y manejo de casos de TB.

Para la aplicación clínica, se han desarrollado equipos comerciales que proveen *primers* y reactivos para caracterizar los amplicones, sin secuenciar. Estos equipos permiten determinar si se está frente al complejo *M. tuberculosis* y si el aislamiento porta alguna de esas mutaciones que con mayor frecuencia lo hacen resistente a un determinado fármaco, lo más frecuente es que investiguen mutaciones asociadas a RR.

Cuando se emplea LiPA, los amplicones, generados a partir de *primers* con una marca cromógena, son hibridados sobre una tira que tiene inmovilizados segmentos de ácidos nucleicos característicos de *M. tuberculosis*, sin mutar y con las mutaciones más frecuentes que determinan resistencia. Es posible ver con qué segmentos inmovilizados hibridan los amplicones por su marca que desarrolla color cuando se revela la prueba. El proceso puede ser completado en no más de 48 horas, partiendo de un cultivo positivo o de una muestra con BK altamente positiva.

Además, la industria biotecnológica ha logrado desarrollar equipos y *softwares* de PCR en tiempo real que permiten captar la señal que emiten las sondas al hibridar en una solución, cuantificarlas y representarlas en una curva, mostrando así el progreso de la reacción. Más aún, se ha logrado

desarrollar y simplificar todo este proceso dentro de un cartucho cerrado y desechable, que contiene todos los reactivos y enzimas necesarios. Se minimiza así el riesgo de transferencia de material amplificado de una muestra a la otra, lo que puede ocurrir con mayor probabilidad con el LiPA u otros sistema molecular "abierto". Sólo requiere tratar la muestra con una solución descontaminante y cargarla dentro del cartucho. El primero de estos sistemas totalmente automático (Xpert) emplea sondas del gen *rpoB* "salvaje" o sea del bacilo de la tuberculosis sin mutar. Cuando no se produce hibridación alguna, no se detecta *M. tuberculosis*. Si se produce hibridación con todas las sondas se interpreta que existe *M. tuberculosis* en la muestra y que no tiene ninguna de las mutaciones que más frecuentemente lo hacen resistente a R. Si alguna sonda que investiga las mutaciones asociadas a resistencia no hibrida o hibrida tardíamente, se interpreta que la cepa de *M. tuberculosis* detectada en la muestra es resistente a R. El proceso se completa en un par de horas.

Precisión y significación clínica de los resultados

Con los métodos estandarizados y validados para investigar la sensibilidad de *M. tuberculosis* a los fármacos de primera línea en cultivo, los laboratorios con buena calidad de trabajo pueden alcanzar muy alta eficiencia con la I (97%) y R (99%). Con estas drogas los resultados son claros y reproducibles porque:

- a) inhiben el bacilo a muy baja concentración, mucho más baja que la empleada en la clínica y la elegida para la PS
- b) es poco frecuente aislar bacilos que presenten muy bajo porcentaje de clones resistentes o resistencia a bajos niveles de estas drogas

Se ha descrito que la resistencia borderline a R de algunos aislamientos de *M. tuberculosis* puede no ser detectadas por el sistema MGIT320/960 porque, como se ha explicado, interrumpe la lectura a un tiempo determinado, y por lo tanto no evidencian

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

el desarrollo tardío que pueden presentar este tipo de aislamientos.

Cuando se aplican con calidad métodos moleculares validados hasta el momento de la publicación de esta Guía, es posible detectar la presencia del bacilo en prácticamente todas las muestras que tienen alta carga de bacilos (BK positiva) y en la mayor parte pero no el 100% de las muestras pulmonares con BK negativa y cultivo positivo. Es decir que son métodos menos sensibles que el cultivo. Cuando se detecta la presencia del bacilo y las mutaciones asociadas a resistencia a R ó I, puede diagnosticarse con alta certeza la resistencia, especialmente en escenarios o grupos poblacionales con elevada prevalencia de resistencia a esos fármacos. En general, cuando se infiere que existe resistencia sin identificar la mutación que se ha producido existe un cierto riesgo. En efecto, con baja frecuencia, podría estar detectándose una mutación que no determine resistencia al fármaco o “silente”. Por otra parte, cuando no se encuentran estas mutaciones, aún es posible que existan y no sean detectadas por los sistemas comerciales, porque sólo investigan las más frecuentes entre las conocidas. Como ya se ha comentado, no han sido descubiertas todas las mutaciones que originan resistencia. Además, la resistencia a los fármacos puede ser más compleja que la simple presencia o ausencia de mutaciones en determinados genes. En el caso la R, se pueden detectar con equipos de origen comercial cerca del 95-97% de los aislamientos resistentes del bacilo que aparecen en la práctica clínica. La sensibilidad es mucho más baja con otros fármacos. Particularmente es el caso de I, por la cantidad de genes que están involucrados en la resistencia, es más complejo el abordaje. Por estas consideraciones, las PS moleculares son útiles para acelerar la detección de resistencia, pero deben ser complementadas con las convencionales realizadas en medios de cultivo.

En suma, la evidencia sostiene que la resistencia determinada por el laboratorio a R en primer lugar, y luego a I, tienen alta precisión y correlación con el resultado del tratamiento de primera línea. Sin embargo, los sistemas comerciales desarrollados

para evaluar molecularmente la actividad de I tienen sensibilidad más limitada.

El resultado de la PS a otras drogas adquiere importancia cuando se está frente a casos con intolerancia a los fármacos de primera línea, con TB resistente a I, y más aún para casos con TB RR, MR o XDR. La mayor parte de los otros fármacos son menos activos que la I y R frente al bacilo, pueden tener efecto a una concentración cercana a la empleada en la práctica clínica y/o es más frecuente que aparezcan aislamientos con resistencia moderada o intermedia. Todo esto condiciona la precisión y reproducibilidad de la PS. Los ejercicios entre laboratorios supranacionales han demostrado que es posible alcanzar alta eficiencia, semejante a la de I y R, para ensayar aminoglucósidos y FQN, y un poco menor para capreomicina. Para la Z no se cuenta con una PS de referencia que sea totalmente confiable, por todas las peculiaridades descritas acerca de los mecanismos de acción y resistencia.

La evidencia acerca del valor que tienen las PS a drogas diferentes de I y R, para predecir la efectividad de los fármacos en los esquemas terapéuticos, es escasa, inconsistente o difícil de interpretar debido a que cada fármaco es empleado en combinación con otros. Por estas razones, los resultados individuales deberían ser cuidadosamente interpretados por profesionales de laboratorio y médicos, especializados y experimentados, en relación con la historia de tratamiento, los resultados de anteriores PS y la evolución clínica y bacteriológica que se haya documentado para el caso. Los resultados adquieren consistencia cuando coinciden los correspondientes a distintos aislamientos del mismo paciente, o evolucionan hacia la resistencia en concordancia con esquemas inadecuados de tratamiento o incumplimiento del mismo. Sin duda, el perfil de sensibilidad completo a fármacos alternativos, auxiliares o de segunda línea, define la dificultad que presenta cada caso para su tratamiento, según el número y tipo de fármaco para el que se detecte resistencia.

El valor predictivo de cualquier prueba disminuye cuando el fenómeno que investigan es poco

frecuente. Así, en escenarios con baja prevalencia de resistencia a los fármacos antituberculosis, conviene confirmar todo resultado resistente. De esta forma, es posible minimizar la incidencia de resultados falsamente resistente originados por algún error.

Como la resistencia a Z ocurre más frecuentemente entre aislamientos RR (MDR, preXDR y XDR) el resultado “resistente” tiene mayor valor predictivo si la prueba es realizada para casos con RR. Es conveniente considerar esto, en especial porque no se cuenta con una PS de referencia para esta droga.

Frente a resultados que deben ser interpretados, el informe de los laboratorios no se debería limitar a “sensible” o “resistente”, sino que deben agregar las consideraciones basadas en la evidencia que guíen al médico.

***La garantía de calidad de la PS es esencial
La falsa resistencia puede privar al
paciente
de la(s) mejor(es) droga(s) disponibles
y la falsa sensibilidad podría encubrir
la necesidad de hacer correcciones al
esquema terapéutico***

***Ambos errores pueden tener graves
consecuencias para el paciente y la
comunidad***

ORGANIZACIÓN DE LA OFERTA DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD EN LA RED DE LABORATORIOS

Logística

El LRN, aliado con la conducción del Programa de Control de la Tuberculosis, debe normar y organizar la oferta de la PS para todos los pacientes, priorizando aquéllos que tienen riesgo incrementado de padecer TB resistente a los fármacos hasta lograr la cobertura universal. Deben, además, conducir el proceso para que el acceso sea equitativo y oportuno y los resultados sean confiables para el buen manejo clínico de los casos.

Para asegurar resultados oportunos de la PS, el sistema de salud debe disponer y utilizar adecuadamente herramientas básicas tales como:

- Formularios (formatos) que permitan identificar los pacientes con riesgo de resistencia,
- Envases para el transporte seguro de muestras y aislamientos,
- Transporte regular y con adecuada bioseguridad,
- Sistema eficiente de telecomunicación en red (teléfono, fax, computadora o dispositivos móviles con conexión a Internet y correo electrónico).

Toda demora tiene consecuencias nocivas, comenzando por el perjuicio que puede tener el paciente que está recibiendo un tratamiento inefectivo o sub-óptimo. El retardo en el envío de las muestras puede originar contaminación que inhabilite la PS, lo que es más crítico cuando se emplea medio líquido. También puede reducir la viabilidad del bacilo lo que resulta en un mayor porcentaje de resultados inválidos con cualquier método fenotípico.

Luego, interviene la red de laboratorios que, para asegurar celeridad y calidad, debe tener estar muy organizada, integrada y conectada con el sistema de salud y el Programa de Control de TB, equipada, abastecida, dotada con personal muy capacitado y con un sistema de gestión de calidad.

Agilización de los procedimientos del laboratorio

Se han difundido algunos conceptos errados que, por sí mismos, generan retraso en el diagnóstico, tales como que no existen urgencias frente a casos de TB o que una PS inexorablemente requiere al menos 4 meses. La posibilidad, por ejemplo, de que un paciente HIV positivo esté afectado por una cepa del bacilo MDR requiere una respuesta urgente del laboratorio, porque de ello puede depender la vida del paciente. Asimismo, el pronóstico del cualquier caso de TB depende de la administración de un tratamiento adecuado

y, por lo tanto, de la rápida detección de la resistencia a los fármacos que son claves para el éxito de esos esquemas. Para rectificar estos conceptos, los programas de capacitación y organización diseñados para la red de laboratorios deberían considerar puntos clave como:

- distinción de muestras y aislamientos urgentes cuyo estudio debe ser priorizado
- consecuencias de las demoras en la evolución del paciente por
 - acumulación de muestras o aislamientos sin procesar o derivar al laboratorio de referencia
 - inspección infrecuente de los cultivos
 - realización de repiques innecesarios antes de investigar los aislamientos
 - postergación de la comunicación de resultados

Es necesario disminuir al mínimo las demoras evitables que deben ser distinguidas de las que son inherentes a los métodos disponibles, y que se presentan en el siguiente cuadro.

Tiempo promedio que demoran los métodos avalados por OMS para producir resultados de PS

Método	Tiempo para producir resultado ^a	
	Resistente ^b	Sensible ^c
Proporciones en Löwenstein Jensen	3 semanas	40 días
agar Middlebrook 7H10	2-3 semanas	3 semanas
MGIT	5 a 14 días	5 a 14 días
Rápido "casero" para I y R	7 a 14 días	7 a 14 días
Molecular	2-3 horas a 2 días	----

a) Para investigar muestras con BK positiva, ó aislamientos del bacilo. Si se parte de muestras con BK negativa, se agrega el tiempo necesario para obtener un cultivo positivo previo que, dependiendo de la cantidad de bacilos presente,

es de aproximadamente 30- 60 días en medios sólidos, y la mitad de ese tiempo en medios líquidos.

b) La mayor parte de los casos con TB MDR pueden ser detectados e informados en los plazos listados. Para informar la sensibilidad a los antibióticos es necesario prolongar la incubación durante el período mencionado en c) porque es necesario asegurar que no desarrollen clones resistentes tardíamente.

Selección de métodos y laboratorios

Métodos avalados por OMS para la realización de la prueba de sensibilidad

En medios de cultivo (fenotípicos)

con drogas de primera y segunda línea

- Método de las proporciones en medio sólido
- La adaptación del método de las proporciones en MGIT
- Razon (o proporción) de resistencia
- Concentraciones absolutas

solo con I y R

- Nitrato reductasa o nitrataza o método de Griess
- Métodos colorimétricos o REMA (sigla del nombre en inglés resazurin microplate assay)
- MODS (sigla del nombre en inglés microscopic observation drug susceptibility)

Moleculares (genotípicas)

para R, I, FQN e inyectables de segunda línea

- LiPA para R
- PCR automatizada, en tiempo real, en cartuchos (Xpert MTB/RIF)

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

El medio MGIT, el equipo para su lectura y los sistemas moleculares recomendados por OMS son comerciales. El resto son métodos cuyos reactivos se preparan completa o parcialmente en el laboratorio (“caseros”).

Como se ha dicho, Latinoamérica ha empleado extensamente el método de las proporciones, motivo por el cual fue seleccionado en esta Guía entre los “caseros” para ensayar todas las drogas. También se ha seleccionado el método de la nitrataza para la investigación rápida de I y R, porque es el de más fácil aplicación en los laboratorios latinoamericanos que no tienen condiciones o recursos para emplear el sistema MGIT y requiere reactivos y equipos habitualmente disponibles en los laboratorios que realizan cultivo en medio de LJ. Por emplear medio sólido, es más ventajoso que el MODs para laboratorios que no tienen un alto estándar de bioseguridad.

Como se describe más adelante, la PS fenotípicas requieren un importante refuerzo de infraestructura y medidas de bioseguridad en el laboratorio, porque implican la manipulación de gran número de bacilos vivos y la concentración de aislamientos que son resistentes a los fármacos. Por otra parte, son demandantes de recursos humanos suficientes y capacitados para realizar técnicas laboriosas y relativamente complejas. Por estas razones, en la mayor parte de los países se mantienen concentradas en el LRN. Esta situación puede ser satisfactoria en países con baja carga de TB y en especial de TBMDR, limitada extensión territorial y con un LRN fácilmente accesible y bien comunicado con el sistema de salud.

En los últimos años se han desarrollado métodos que permiten que los laboratorios intermedios identifiquen rápidamente los casos con TB RR ó MDR y los seleccionen para que luego puedan ser investigados más exhaustivamente en el LRN. Esta organización puede resultar conveniente en áreas con alta carga de TB, con difícil acceso al LRN y con una red de laboratorios con recursos adecuados. Se debe tener en cuenta que, para mantener la calidad de la PS, es necesario realizarla con cierta

frecuencia (un promedio mínimo de 8 pruebas mensuales). Además, estos laboratorios deben estar calificados inicialmente y luego quedar integrados a un programa regular de evaluación externa de la calidad conducido por el nivel de referencia nacional. Aun cuando la PS a drogas diferentes de I y R también esté descentralizada, es conveniente que se remitan al LRN los aislamientos de casos con TB resistentes I, RR o MDR detectados por el nivel intermedio de la red, para que éste confirme la resistencia, investigue la sensibilidad a otros fármacos y concentre la información necesaria para la vigilancia de la TB MR.

También es necesario remitir al LRN los aislamientos de pacientes con intolerancia a fármacos para que el conocimiento del perfil de sensibilidad completo contribuya a guiar tratamientos alternativos, en el caso en que fueran necesarios.

Cuando se decide descentralizar la PS para facilitar el acceso al diagnóstico rápido de TB MDR, debería priorizarse la implementación de la prueba más rápida que sea factible de aplicar en hospitales o centros de referencia para el tratamiento de la TBMDR y de pacientes HIV positivos (en especial los que presten asistencia a pacientes con mayor riesgo de TB como por ejemplo población pobre o con otro tipo de vulnerabilidad).

Ventajas y desventajas de la (des)centralización de la PS en la red de laboratorios

Nivel de la red en el que se implementa la PS	Ventajas	Desventajas
un unico laboratorio central	entrenamiento gestión de calidad simples	puede haber sobrecarga de trabajo y resultados demorados
un laboratorio central y otros calificados	el LRN puede dedicar más tiempo a otras actividades demandantes mayor cobertura y rapidez para la detección de TB RR/MDR	entrenamiento gestión de calidad complejos

Por su parte, el LRN debe tener implementados tanto métodos rápidos como convencionales. El método rápido puede ser empleado para detectar resistencia a R y eventualmente también a I y algunas drogas de segunda línea, y seleccionar los casos que luego serán sometidos a investigación más completa y costosa. Como se ha mencionado los más rápidos son los moleculares. Son, además, útiles para investigar aislamientos que portan mutaciones que limitan su reproducción in vitro o que están muertos por mala conservación de la muestra. Luego, los métodos convencionales serán empleados para resolver dudas, investigar la sensibilidad a otros fármacos y cepas con comportamiento borderline o anormal. Para estos fines es recomendable que el LRN mantenga su capacidad técnica y calidad demostrada para realizar el método de referencia de las proporciones en medio sólido. Ese método es, también, el de referencia para evaluar nuevos métodos. La determinación de CIM es útil para evaluar fármacos nuevos, cuya PS no está aún estandarizada, o evaluar el nivel de resistencia frente a algún fármaco particular en casos conflictivos.

Se comparan a continuación algunas características generales de los métodos desarrollados por la industria que es necesario considerar en el momento de seleccionarlos y combinarlos.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

**Características de los métodos desarrollados por la industria
y recomendados por OMS para la realización de la PS**

	Xpert MTB /RIF	LiPA	Medio líquido con lectura automatizada
Aplicación	detección del complejo <i>M. tuberculosis</i> y de su resistencia a R	detección del complejo <i>M. tuberculosis</i> y de su resistencia a R , I .inyectables y FQN Identificación de otras micobacterias	detección de todas la micobacterias en cultivo PS de <i>M. tuberculosis</i> a drogas de 1a y 2da línea
Sensibilidad para detectar el bacilo de la tuberculosis	mayor que la BK menor que el cultivo	alta con muestras con BK+, limitada con muestras BK-	máxima detecta más casos aún que el cultivo convencional en LJ
Tiempo para la producción de resultados	en el día (la reacción se completa en 2 horas)	2 días	para la detección del bacilo de la TB: 2 a 4 semanas (dependiendo de la cantidad de bacilos presentes en la muestra) y 1 ó 2 semanas adicionales para la PS
Cantidad de muestras que pueden ser procesadas por jornada de 8 horas	12 con el equipo de 4 módulos. pueden ser procesadas por una única persona	depende de los RRHH y equipamiento para biología molecular disponibles	normalmente el limite no está dado por el equipo, sino por los RRHH disponibles (a)
Tiempo del personal por muestra procesada	menor	medio	mayor
Nivel de bioseguridad requerido	bajo	alto	alto
Requisitos de las muestras	volumen de al menos 1 ml; no es tan crítica la temperatura ni la demora desde la recolección	no es tan crítica la temperatura ni la demora desde la recolección	frescas no sobreexpuestas al calor
Calibración /mantenimiento	a distancia, los módulos defectuosos pueden ser reemplazados (se han registrado demoras en el reemplazo)	normalmente disponible en el país para los equipos genéricos	requiere asistencia técnica de la firma en el país, en el caso de desperfecto

(a) El equipo MGIT 960 puede incubar 960 tubos, el MGIT320 puede incubar 320 tubos
RRHH: recursos humanos

Para controlar la TB son necesarias intervenciones en el largo plazo y, por lo tanto, métodos diagnósticos que puedan ser sostenidos en el tiempo. Entonces, la demanda creciente de diagnóstico rápido debería ser satisfecha después de hacer un riguroso análisis de las alternativas a la luz de:

- las estrategias del Programa Nacional de TB los recursos y organización de la red de laboratorios
- la experiencia y aceptación del personal del laboratorio
- la inversión inicial y erogaciones para sostener en el largo plazo (aun después del retiro de posibles donantes o socios)
 - la logística básica,
 - el abastecimiento regular de insumos,
 - el mantenimiento de la infraestructura, bioseguridad y equipamiento del laboratorio,
 - la gestión de calidad.

Es necesario validar cada método que se adopte en el escenario donde va a ser utilizado e incluirlo en el sistema de gestión continua de la calidad. Toda innovación debería ser inducida en laboratorios que hayan demostrado competencia, que sean accesibles para el sistema de salud y que puedan concentrar la investigación de los pacientes priorizados para aplicar la innovación.

Infraestructura y equipamiento

En general, un laboratorio que realiza PS requiere suministro eléctrico continuo y confiable.

- (los equipos de lectura automatizada de cultivos en medios líquidos pueden tener una batería propia que los mantienen operando por un tiempo limitado pero no el resto del equipamiento; si las interrupciones son frecuentes, se debe instalar una UPS para cada equipo crítico o un generador de back-up para todo el laboratorio;

la CSB debe tener obligatoriamente UPS o estar conectada a un generador)

- Regulación de la temperatura ambiente. a 24-26°C, para el confort del personal, para el equipamiento y para almacenar los reactivos /equipos comerciales que no requieran refrigeración pero que pueden alterarse a muy altas temperaturas. Los acondicionadores de aire deben ser más potentes en las áreas donde se agrupan los equipos que disipan calor (autoclave, refrigeradores, etc)
- Almacén para insumos espacioso.

La Organización Mundial de la Salud ha definido los siguientes requisitos mínimos de bioseguridad para cada método.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

**Requisitos mínimos de bioseguridad recomendados por OMS
para la investigación de tuberculosis**

Nivel de riesgo biológico	Actividad	Infraestructura esencial, mínima, para disminuir y controlar el riesgo	
		biológico	de transferencia de amplicones
Bajo	Preparación y tratamiento de muestras para - BK, - cultivo con método de Ogawa Kudoh - pruebas moleculares directas en cartuchos cerrados con sistemas automatizados (ej. Xpert MTB/RIF)	a) Laboratorio separado del acceso público y de áreas administrativas b) Superficies impermeables, lisas c) Ventilación por ventanas o mecánica que permita renovar el aire d) Si hay acondicionadores de aire, de tipo <i>split</i> , adecuadamente ubicados para no originar corriente de aire en el área de trabajo	
Moderado	Tratamiento y centrifugación de muestras para - cultivo - PS directa (por cualquier método bacteriológico o LiPA)	a, b, d más e) Extracción de aire a hacia un área abierta, no transitada, renovación de aire (6 a 12 cambios por hora), sin recirculación de aire a otras áreas del edificio f) Autoclave en el laboratorio de contención de riesgo o en un laboratorio contiguo g) Centrifuga con portatubos desmontable y con tapa h) CSB clase I (EN12469/NSF49) o II A2 (NSF49) o Clase II (EN12469) correctamente instaladas recertificadas al menos anualmente conectada (s) a un generador (batería) de emergencia que brinde al menos 15 minutos de autonomía	3 ambientes separados con acceso restringido para LiPAs u otros métodos moleculares "abiertos"
Alto	Procesamiento de cultivos positivos y/o suspensiones de <i>M. tuberculosis</i> viable para - identificación - PS indirecta (por cualquier método bacteriológico o molecular)	a, b, d, f, g, h más i) Antecámara (entrada por doble puerta al laboratorio de contención) j) Direccionamiento del aire desde áreas "limpias" hacia las "contaminadas" y de allí al exterior previo pasaje por filtro HEPA (mediante ducto de la(s) CSB conectado(s) hacia el exterior, si no hay otro sistema)	

Nótese que se encuadra dentro del nivel de riesgo moderado a las PS directas (el método de la nitratasa o de las proporciones) siempre y cuando no se abran en el laboratorio tubos con cultivos positivos. Esto implica que los laboratorios que sólo reúnen requisitos para operar con riesgo moderado no deben identificar al microorganismo desarrollado en medio de cultivo. Una alternativa para estos casos consiste en incluir en la PS directa I, R y PNB que es un inhibidor del complejo *M. tuberculosis*. Si el cultivo presenta características diferentes de *M. tuberculosis* y/o resistencia a los fármacos, debe ser enviado al laboratorio de referencia para verificar su identificación y sensibilidad. Los métodos moleculares, en cambio, aseguran la

identificación del complejo *M. tuberculosis* con riesgo bajo (en cartuchos cerrados) o moderado (LiPA) si son realizados directamente a partir de muestras clínicas.

Cualquier procedimiento que implique la apertura de cultivos positivos de *M. tuberculosis* es encuadrado dentro del nivel de riesgo alto

Equipos e insumos

Requerimientos de los métodos seleccionados en estas Guías Técnicas para la realización de la PS

Requerimientos	Métodos no comerciales		Métodos comerciales		
	Proporciones en LJ Nitrato reductasa	Proporciones en agar	Con medios líquidos	LiPA	PCR en tiempo real en cartuchos
Equipos (*)	incubador coagulador		sistema automatizado para la detección de crecimiento y software (opcional)	sistema de agua ultrapura libre de nucleasas ciclador térmico sonicador baño de agua bloque calentador microcentrifuga cabina libre de ADN	equipo computadora y software micropipetas
Insumos	disponibles económicos estables a largo plazo (excepto los huevos)	pueden ser necesario gestionar la importación en algunos países costo mediano vencimiento a mediano plazo	pueden ser necesario gestionar la autorización de algún insumo en algunos países mayor costo vencimiento a mediano plazo		
Comercialización	varios fabricantes y proveedores locales		dependencia de un único fabricante (y posiblemente proveedor) de reactivos, equipo y software		

(*) Además de los básicos necesarios para todos los métodos, para la preparación de reactivos y muestras o aislamientos: destilador, refrigeradores, congelador, balanza electrónica, agitador tipo vortex, centrifuga, CSB, UPS, autoclave.

Estos requerimientos y características de comercialización deben ser cuidadosamente analizadas, y las dificultades previamente solucionadas antes de adoptar un método, particularmente en escenarios con presupuestos bajos o variables de un año a otro, falta de soporte eficiente para la importación, procedimientos de compras desorganizados o no confiables, distribuidores locales sin interés para licenciar e importar reactivos, o con intervenciones de aduana complejas. Se debe considerar que el costo de reactivos importados puede resultar ser 2-5 veces mayor que el precio de catálogo, según los impuestos y condiciones de comercialización que se apliquen en cada país.

Para el caso en que se deban adquirir insumos con fecha de vencimiento, deben establecerse en los

procesos de compras la exigencia de entrega de insumos con vida útil apropiada según la frecuencia con la que se haga la compra. Una alternativa conveniente es convenir compras con entregas parciales de los insumos, en fechas programadas durante el año. Por otra parte también debe considerarse que algunos antibióticos y algunos insumos empleados para los métodos comerciales exigen mantener la cadena de frío durante el transporte y almacenamiento. El sistema Xpert MTB/RIF requiere disponer de mucho espacio con temperatura adecuada para el almacenamiento de cartuchos.

Para los métodos comerciales es muy importante establecer buenos contratos con las empresas para asegurar la instalación de los equipos, entrenamiento del personal, actualización de software, calibración

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

y mantenimiento regular y asistencia técnica inmediata ante un desperfecto (aun en laboratorios alejados de la capital del país en el caso en que se descentalice la PS).

El laboratorio que realiza PS debe contar con equipamiento relativamente complejo y refrigeradores que mantengan estrictamente su temperatura para asegurar la conservación de medios de cultivo y reactivos. Por lo tanto, es necesario que cuente con

un servicio de mantenimiento preventivo y correctivo regular y financiado.

Toda interrupción del funcionamiento de equipos esenciales puede llevar a la interrupción de la oferta de la PS y, por lo tanto, al abandono de la asistencia de los pacientes que requieren de este resultado para recibir el tratamiento más apropiado.

Recursos humanos

Perfil y entrenamiento del personal requerido para la realización de la PS

	Métodos no comerciales		Métodos comerciales		
	Proporciones en LJ Nitrato reductasa	Proporciones en agar	Con medios líquidos	LIPAs	PCR en tiempo real en cartuchos
Soporte para Procesos de compras Preparación de medios y reactivos	1 vez/año permanente	frecuente permanente	frecuente no	frecuente no	frecuente no
Entrenamiento y experiencia	cultivo y PS		cultivo y PS Operación de <i>software</i>	Procesamiento de muestras Técnicas moleculares	Operación de <i>software</i>

Sistema de registro

Independientemente del método que se adopte, el laboratorio debería tener una o más computadoras y una base de datos que le permitan

- registrar el ingreso de material,
- elaborar listas de pruebas a realizar,
- registrar todos los resultados de laboratorio,
- rastrear en todo momento los estudios realizados con cada material, sus resultados y los responsables de cada estudio,
- elaborar e imprimir informes,
- analizar información de cada paciente, del conjunto de pacientes o de grupos de pacientes seleccionados según se requiera para la vigilancia epidemiológica.

Para optimizar el tiempo y evitar errores, el laboratorio debe evitar la multiplicidad de registros escritos y la repetición de ingreso de la misma información en varios registros.

La base de datos del laboratorio debe contener la información mínima requerida por el formulario de solicitud de estudios bacteriológicos normado por el Programa de Control de TB, incluyendo la identificación de factores de riesgo de TB resistente a los fármacos. También debe contener la identificación y las características de las muestras o aislamientos recibidos.

La base de datos debe permitir analizar la información para aportar la siguiente información mínima para la vigilancia de la TB MDR.

Información mínima para la vigilancia de la TBMR

	Número de casos						
	Total	con PS a R	RR	con PS a IR	MDR	con PS a DSL	XDR
TOTAL							
Categoría de riesgo							
Falla							
Recuperación después de pérdida de seguimiento							
Recaída							
Contacto caso MDR							
HIV positivo							
Privado de libertad							
.....							
.....							
Demora en el diagnóstico (*)							
Número de casos con información							
Media (días)							
Mínimo (días)							
Máximo (días)							

(*) Días entre la identificación del paciente con riesgo y la disponibilidad del resultado de la PS para I y R según registros del laboratorio

Se considera día de identificación del paciente con riesgo a aquel en el que se diagnostica TB si se ofrece PS universal ó se obtiene el resultados bacteriológico que indica falla de tratamiento o se detecta TB asociada a HIV el resultado del laboratorio detecta TB MDR en el foco de ese caso

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Nótese que la vigilancia requiere el análisis de los resultados de las PS de los casos de TB identificados en el período que corresponda y no de las muestras ensayadas.

Para la evaluación de cohortes, también será necesario conocer el número de casos con TB MDR con conversión bacteriológica, antes y después de los 6 meses de tratamiento.

El sistema de información de un laboratorio de referencia también debe ser útil para monitorear en tiempo real:

- la solicitud, recepción, calidad y stock de insumos,
- la demora en la liberación de resultados de las pruebas diagnósticas,
- los resultados de los controles de calidad internos y externos,
- la carga de trabajo estratificada según origen y características de los pacientes, tipo de prueba realizado, etc,
- incidentes y accidentes de laboratorio,
- desarrollo de recursos humanos (entrenamiento, capacitación),

Los LRN preparados para alto riesgo biológico, deberían contar con una o más computadoras ubicadas dentro del ACRB y conectada en red con una o más computadoras ubicadas fuera. También es conveniente contar con un escáner dentro del ACRB para capturar imágenes de documentos, guardarlos y ponerlos disponibles en red. De esta forma, se minimiza, y hasta se pueden eliminar, los registros escritos dentro del ACRB. A la vez, el personal técnico y profesional puede observar resultados, elaborar e imprimir informes y analizar la información en áreas limpias, sin necesidad de sacar registros del ACRB.

Los softwares de equipos de lectura automatizada de cultivos pueden ser de adquisición opcional y permiten visualizar las curvas de crecimiento de los aislamientos. Esto puede ser superfluo para detectar bacilos en cultivos, pero tiene mayor importancia para la lectura de la PS. Las curvas

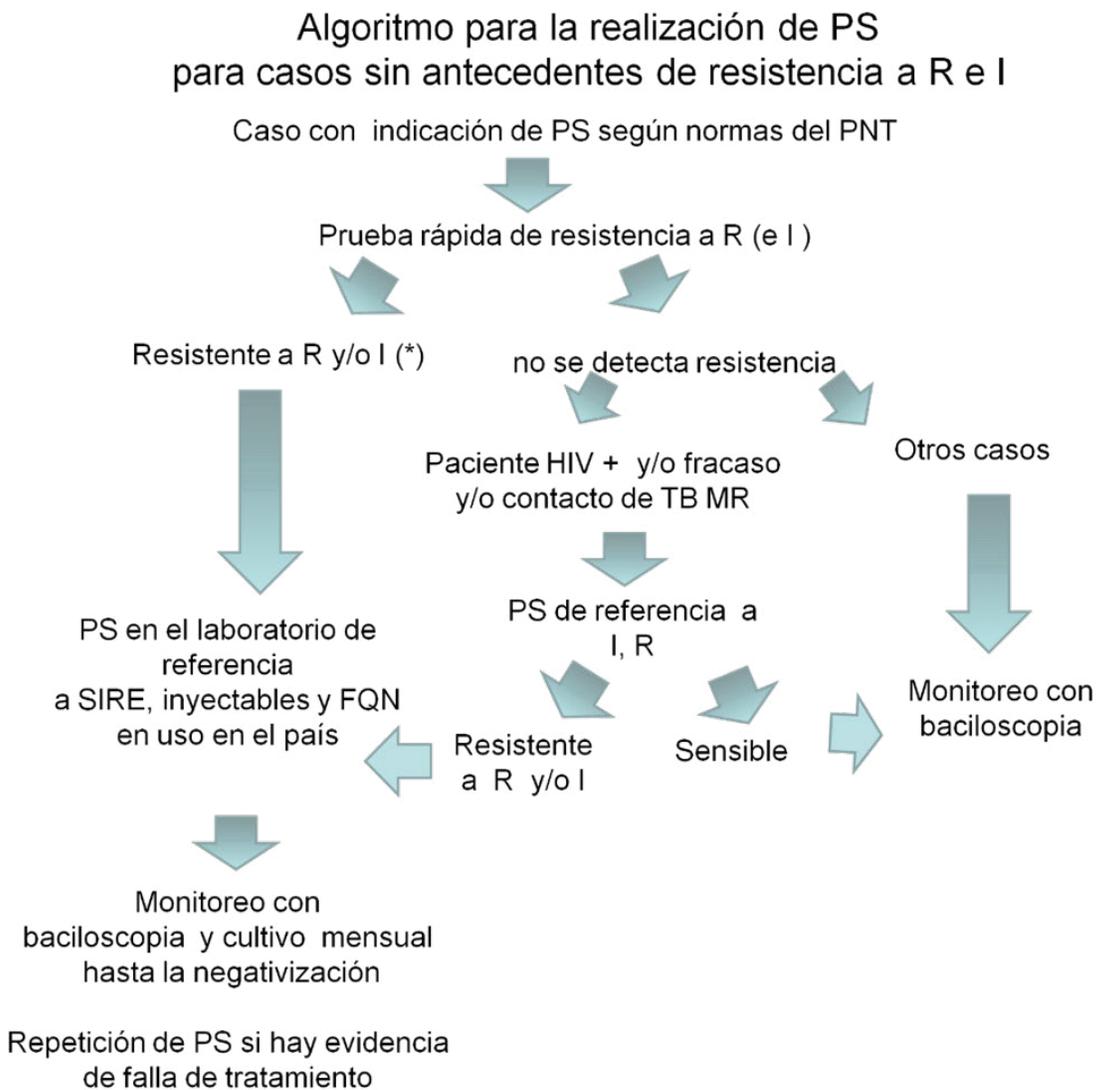
permiten identificar con facilidad los aislamientos que tienen un comportamiento borderline frente algún antibiótico, o anomalías en las pruebas. Es posible tener acceso remoto, desde un área limpia, a la información producida por estos equipos, en tiempo real.

Cuando se adoptan métodos comerciales, dependientes de un equipo y software, es necesario asegurar en los contratos la propiedad absoluta para el sistema de salud de la información que se ingrese en la base de datos y retención de esa información en el caso en que se decida no mantener el sistema. Para este último fin, puede ser necesario solicitar la asistencia de las empresas para crear una interfase entre el software del equipo y el empleado habitualmente por el laboratorio, de manera que el primero transfiera y almacene la información en el segundo. Otra opción consiste en solicitar la adaptación del software del equipo para que contenga toda la información mínima arriba mencionada, y asegurar la su exportación a una base de datos que pueda ser almacenada y analizada por el personal del laboratorio. También se debe procurar la conectividad de la base del LRN con la del Programa Nacional de Control de TB, y los sistemas que puedan existir on line en el país para el manejo de casos y/o la vigilancia epidemiológica.

La información en registros en papel y en bases de datos debe resguardarse con seguridad y durante el tiempo que exijan las normas institucionales y nacionales. Las bases de datos deberían ser almacenadas y protegidas en copias de resguardo, una de las cuales debería estar resguardada fuera del edificio ocupado por el laboratorio, para el caso de siniestro. Todos los registros deben quedar disponibles para el sistema de salud en el largo plazo. Al mismo tiempo es necesario resguardar la confidencialidad de los datos almacenados y evitar alteraciones indebidas. Para este fin se deberán determinar normas para salvaguardar los datos y, si se trata de bases de datos, la adopción de contraseñas para el personal autorizado.

Algoritmo de trabajo

A la luz del conocimiento disponible y los esquemas de tratamiento aplicados hasta el momento de redacción de estas Guías es conveniente investigar la sensibilidad a los fármacos siguiendo la siguiente secuencia:



(*) Para áreas o poblaciones en las que la prevalencia de RR es muy baja, es recomendable verificar rápidamente el resultados con una segunda prueba rápida realizada con una nueva muestra del paciente.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

La PS inicial a I y R debería realizarse en forma directa, por métodos bacteriológicos avalados, toda vez que se cuente con una muestra BK positiva. En otras situaciones se deberá proceder primero a cultivar la muestra del paciente para luego hacer la PS indirecta. Los laboratorios sin condiciones adecuadas para cultivar con métodos que requieren centrifugación, alejados de un laboratorio de referencia o que no cuentan con un sistema de transporte frecuente de muestras, pueden sembrar las muestras empleando el Método de Kudoh-Ogawa, y enviar los tubos sembrados al laboratorio de referencia en cuanto sea posible.

Para pacientes con TB MDR el conjunto de drogas a ensayar puede incluir etionamida o protionamida y las que más recientemente se están experimentando como bedaquilina, delamanid, linezolid y clofazimina. Es necesario mantener el conocimiento actualizado sobre la evidencia que se publique en relación con la precisión y valor para predecir éxito o fracaso del esquema terapéutico que tengan las PS realizadas con estas drogas.

Como en todos los casos de TB, la BK y especialmente el cultivo tienen un rol fundamental para monitorear el tratamiento de un caso con TB MDR que está recibiendo un esquema con fármacos de segunda línea. Con los esquemas recomendados en el momento de redacción de esta Guía, la PS debería ser repetida al 6to mes de iniciado el tratamiento con fármacos de segunda línea, para orientar la continuación de la terapia. Y luego, si el paciente permanece con cultivo positivo, se debería ser repetida 6 meses después de cada cambio de esquema.

El acceso al diagnóstico y buena orientación del tratamiento de la TB MDR depende de

- ***Un sistema de salud alerta y ágil para detectar y documentar factores de riesgo, tomar y trasladar muestras al laboratorio con la información necesaria para desencadenar estudios rápidos***
- ***Redes de laboratorios organizadas, con recursos suficientes, claros algoritmos de trabajo, calidad de trabajo asegurada, ágiles canales de comunicación con los servicios de salud y con el Programa de Control de TB***
- ***Laboratorios de referencia nacional eficientes con recursos humanos muy capacitados, buena infraestructura, equipados.***

MATERIAL BIOLÓGICO A INVESTIGAR

Toma y conservación de muestras

Las indicaciones concernientes a la bioseguridad, envases, recolección y número de muestras a recolectar, según la localización de la lesión, han sido detalladamente descritas en la primera parte de esta Guía dedicada a la BK. Son válidas todas las recomendaciones allí presentadas para facilitar y agilizar la recepción de muestras, asegurar su correcta identificación y registro.

Selección de aislamientos

El laboratorio que realiza la PS puede recibir muestras para realizar la PS directamente a partir de ellas, y/o aislamientos obtenidos por otros laboratorios que realizan cultivo.

Los laboratorios de la red que hacen cultivo deben conocer las instrucciones para seleccionar y preparar los cultivos positivos que deban ser referidos al laboratorio que realiza la PS, observando las siguientes recomendaciones:

- Preferir el primocultivo y no un repique o resiembra, ya que en los repiques puede perderse algún clon presente en el aislamiento original.
- Enviar el cultivo al laboratorio de referencia en cuanto desarrolla, ya sea en medio sólido como en líquido, para evitar demoras en el diagnóstico.
- En el caso en que emplee solo medio sólido, se tendrán en cuenta las siguientes recomendaciones para beneficiar la representatividad de los resultados.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Material cultivado

*una muestra investigada para diagnóstico
con abundantes bacilos
(resultado de BK positiva 1+ a 3+)*

*una muestra con escasos bacilos (resultado
de BK negativa o con 1-9 BAAR/frotis) o de un
paciente que está bajo tratamiento) con cultivo
con desarrollo menor a 1+*

Si el laboratorio que ha realizado el cultivo tiene condiciones de bioseguridad adecuadas para alto riesgo biológico, verificar mediante microscopia, la presencia de micobacterias y la ausencia de contaminantes (bacterias, hongos, levaduras, etc.) cuando el aspecto del desarrollo no es el típico de *M. tuberculosis*. Si estuviera contaminado, proceder a la descontaminación previa al envío, y cultivar una nueva muestra del paciente, en caso en que no existiera otro cultivo positivo del mismo paciente.

Si se debe repetir una PS o realizar otra con drogas adicionales y no hay disponible otro aislamiento del paciente, se debe trabajar con los tubos control de la primera PS, nunca con los medios que contienen droga porque allí se seleccionaron clones que resistentes

Tubos a enviar al LRN para la PS

*al menos un tubo con abundante desarrollo
(1+ a 3+)*

*Si, excepcionalmente y por fallas técnicas, el
desarrollo fue menor, enviar varios tubos que
reúnan al menos 20 colonias*

todos los tubos en los que haya colonias

Transporte de material biológico

- Verificar que el o los tubos enviados estén claramente rotulados (si el medio es sólido ubicar el rótulo en la parte contraria al desarrollo de colonias).
- Completar el formulario de solicitud de PS.
- Acondicionar los tubos en los envases apropiados y transportarlos según se describe en el Anexo I de la parte 2 del Manual (Cultivo) y en el Anexo I de esta parte 3 (Prueba de Sensibilidad).

INGRESO Y ORGANIZACIÓN DEL MATERIAL

Se debe sistematizar el trabajo para minimizar el riesgo, evitar confusiones y poder rastrear los procedimientos en el caso en que se presente dudas

Los registros escritos no pueden egresar del ACRB sin ser previamente esterilizados. De manera que, desde un inicio, es conveniente registrar la información en bases de datos, y escanear solicitudes u otros documentos, empleando computadoras conectadas en red fuera y dentro del ACRB.

- Registrar en la base de datos la información consignada en el formulario de solicitud de estudios bacteriológicos correspondiente al caso y al material recibido.
- Registrar los resultados de las pruebas de identificación y de las PS realizadas por el laboratorio que remite el material (si las hubiera hecho).
- Revisar en la base de datos los antecedentes que se conozcan del paciente.

El ingreso al ACRB debe respetar los POEs correspondientes (ver Anexo I).

- Visualizar, verificar y registrar las siguientes características del material recibido.

Inspeccionar el material recibido dentro de una CSB con buen funcionamiento certificado

- Número asignado por el laboratorio que remite el aislamiento.
- Fecha de toma de la muestra que fue cultivada.
- Fecha de cultivo.
- Indicación de si es primocultivo o repique.
- Medio de cultivo en el que se recibe el aislamiento.
- Grado de positividad del cultivo (número de colonias o cruces, según normas),
- Si se trata de medio sólido.
- Aspecto del cultivo.
 - Características compatibles con *M. tuberculosis*
(colonias rugosas y no cromógenas en medio sólido, o flóculos no cromógenos en medios líquidos)
 - Características no compatibles con *M tuberculosis*
 - Contaminado
 - Seco
 - Con exceso de agua

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Asignar un número de registro propio del laboratorio que realiza la PS a todo material que ingrese. Este número será único para todos los procedimientos e informes que correspondan a cada material recibido.
- Registrar los números de muestras o aislamientos que no podrán ser procesados (por. derrame, mal estado contaminación) y disponer que se solicite nuevo material inmediatamente, toda vez que sea posible tomar una nueva muestra.
- Elaborar una lista de trabajo con las pruebas a realizar para cada muestra o aislamiento, siguiendo el algoritmo adoptado por el país (ver como guía el presentado en el capítulo anterior).
- Clasificar el material biológico, según sea muestra para la PS directa, o aislamiento para la PS indirecta.
- Ordenar según su número, en una bandeja, las muestras que requieran PS directa a R, o a I y R.
- Ordenar según su número, en una bandeja, las muestras que requieran PS directa a drogas de 1ª y 2da línea.
- Ordenar en una gradilla, según su número, los tubos con los aislamientos que requieren PS a R o a I y R.
- Ordenar en gradillas, según su número, los tubos de los aislamientos que requieren PS a 1ª y 2da línea.
- Verificar que esté disponible el material necesario para realizar las pruebas, antes de iniciar las tareas, controlando la lista de materiales que figura en cada POE del laboratorio. En general, para todos los métodos que emplean medios de cultivo, el siguiente material debe estar rutinariamente disponible en el laboratorio de contención de riesgo, preferentemente en cantidad superior a la estrictamente necesaria por cualquier contingencia.

Material y equipos que deben estar disponibles en el ACRB

- Marcadores con tinta para vidrio.
- Guantes de látex.
- Frascos autoclavables para descarte de puntas plásticas (si el autoclavado de material es inmediato después de finalizadas las tareas, en un autoclave ubicado dentro del ACRB o en un área contigua, el empleo de hipoclorito no es necesario).
- Bolsas impermeables, autoclavables, de distintos tamaños para el descarte o reciclado de material que será previamente autoclavado.
- Bolsas y recipientes adecuados para el descarte de material punzocortante.
- Papel absorbente para cubrir la superficie de la CSB.
- Alcohol 70° para desinfectar la CSB.
- Hipoclorito de sodio 1% para desinfectar otras superficies.
- Paños desechables para limpieza de superficies.
- Asas bacteriológicas, preferentemente desechables, estériles.
- Tubos de vidrio o plástico muy transparente, desechables, con tapa a rosca, de 15 ml de capacidad, estériles.
- Tubos plásticos con 1-2 ml de capacidad, con tapa a rosca, estériles.
- Frascos y tubos de vidrio con agua destilada, estériles.
- Pipetas plásticas graduadas, envueltas individualmente, de 1 a 10 ml, estériles.
- Pipetas plásticas graduadas con bulbo, envueltas

individualmente, de 1 a 3 ml, estériles.

- Propipetas o pipeteadores automáticos.

- Gradillas de acero inoxidable o polipropileno con capacidad adecuada.

- Bandejas de acero inoxidable o polipropileno, desinfectables.

- Recipiente de acero inoxidable o polipropileno, con tapa, para ubicar el material que debe ser autoclavado y desechado.

- Recipiente de acero inoxidable o polipropileno, con tapa, para ubicar el material que debe ser autoclavado y reciclado.

- Recipiente de acero inoxidable o polipropileno, con tapa, para ubicar las pipetas que deben ser autoclavadas y desechadas.

- Recipiente de acero inoxidable o polipropileno, con tapa, para ubicar las pipetas que deben ser recicladas.

- Cajas desinfectables, preferentemente autoclavables, con capacidad para incubar el total de tubos o placas de 1 ó 2 PS (tubos en posición vertical o placas apiladas, según sea el método empleado).

- Botiquín para incidentes/accidentes (ver Anexo I).

El siguiente equipamiento básico, con buen funcionamiento certificado, debe estar disponible: autoclave ubicado en el mismo ACRB o en un área contigua, refrigeradores, CSB, incubadora o estufa o cuarto estufa, agitador tipo vortex.

En los Anexos II y III de la partes 2 (Cultivo) y 3 (Prueba de Sensibilidad) de esta Guía se describen las características del material y equipamiento necesarios.

Al describir cada método se mencionará el material o equipo adicional al arriba mencionado que particularmente requiere. Para la realización de pruebas moleculares mediante LiPA, es necesario equipar otras áreas de trabajo, fuera del ACRB.

Realizar todos los procedimientos que requieren la apertura de tubos con aislamientos de *M. tuberculosis* dentro de una CSB ubicada en el ACRB que cumpla con los requisitos mínimos de OMS

Extremar las precauciones para minimizar el riesgo biológico y la contraminación cruzada

En la pág. 45 de la parte 2 de este Manual dedicada al Cultivo se enuncian las prácticas recomendadas para minimizar el riesgo y la contaminación cruzada. En el Anexo I de esta parte 3 dedicada a la PS se presentan las medidas seguridad adicionales para el ACRB. Se recomienda revisarlas con detalle.

IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium tuberculosis*

- Comprobar la pureza de los cultivos e identificar si el microorganismo que se va a investigar es *M. tuberculosis* mediante una prueba rápida, antes de realizar la PS indirecta, o después de obtener el desarrollo de una PS directa.

En la parte 2 este Manual (Cultivo) se detalló cómo analizar la morfología para identificar preliminarmente las características compatibles con *M. tuberculosis* y algunas pruebas bioquímicas básicas para confirmar la identificación.

En esta sección se describirán otros métodos útiles que pueden ser realizados a partir de las suspensiones bacterianas madres, inmediatamente antes de realizar la PS o simultáneamente con ella.

Prueba de inhibición del crecimiento con ácido p-nitrobenzoico en medio LJ.

Principio

Se ha demostrado que el PNB inhibe el crecimiento de las especies que integran el complejo *M. tuberculosis* y a otras de micobacterias. Sin embargo, también se ha descrito que, excepcionalmente, algunos aislamientos de otras especies (*M. kansasii*,

M. marinum *M. xenopi* y *M. gastri*), pueden también ser inhibidos.

En laboratorios que sólo pueden operar con riesgo mediano, y que realizan PS directa a partir de muestras, la inclusión de este inhibidor facilita la identificación del germen, sin necesidad de abrir tubos con el cultivo ya desarrollado.

Material biológico a investigar

- Suspensiones madre preparadas a partir de:
 - Muestras con BK positiva
 - Aislamientos obtenidos en medio sólido o líquido
- Cepas control:
 - Sensible: cepa de referencia de *M. tuberculosis* sensible a las drogas, preferentemente *M. tuberculosis* H37Ra

Resistente: cepa de referencia de

Medios de cultivo

Por cada aislamiento y cepa control a investigar

- 1 tubo con medio LJ
- 1 un tubo de LJ con PNB (LJ-PNB) pertenecientes al mismo lote, con calidad controlada, rotulados con el número de cada material a investigar.

Procedimiento

La prueba puede ser realizada simultáneamente con la PS directa o indirecta a drogas antituberculosas.

- Inocular una gota de la suspensión madre o del cultivo obtenido en medio líquido en el tubo de LJ, y una gota en el tubo de LJ- PNB.
- Distribuir el inoculo desde el ápice hasta el fondo del tubo.
- Incubar los tubos en posición vertical a 37°C durante 15 días.

Lectura e interpretación de resultados

- Comparar el crecimiento del tubo LJ y LJ-PNB de cada cepa e interpretar de la siguiente forma:

Tubo LJ	Tubo LJ-PNB	inhibición del desarrollo	Se identifica como
≥ 20 colonias	sin desarrollo	si	complejo <i>M. tuberculosis</i>
≥ 20 colonias	más de 20 colonias	no	micobacteria ambiental
< 20 colonias o negativo	----	----	no interpretable

Asegurar esta interpretación observando la morfología y pigmentación de las colonias.

En caso de dudas, realizar una prueba definitiva (niacina, inmunocromatografía lateral o prueba molecular), o enviar el aislamiento al laboratorio de referencia.

Detección de antígeno MPT64 por inmunocromatografía lateral

Principio

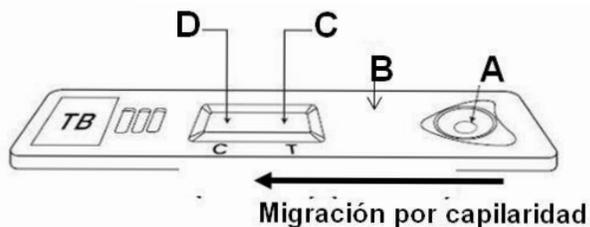
El antígeno MPT64 es específico del complejo *M. tuberculosis* y puede ser identificado mediante inmunocromatografía lateral en un dispositivo de origen comercial que consiste en un casete conteniendo una membrana con 4 áreas:

- destinada a depositar la suspensión bacteriana
- contiene anticuerpo ratón anti-MPT64 marcado que se une a un epítotope de ese antígeno, si está presente en el aislamiento investigado
- tiene inmovilizado en la membrana un segundo anticuerpo ratón anti- MPB64 que reconoce otro epítotope del antígeno y atrapa al complejo formado en el área B

- tiene inmovilizado en la membrana un anticuerpo policlonal anti- inmunoglobulina de ratón que captura el exceso del anticuerpo monoclonal que se desplaza desde el área B; permite verificar si ese anticuerpo está en buenas condiciones y si ha migrado correctamente

La suspensión bacteriana y los anticuerpos no inmovilizados migran por capilaridad

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**



Limitaciones

El equipo no detecta la mezcla de una micobacteria ambiental con el complejo *M. tuberculosis*.

Materiales adicionales

Pueden emplearse pipetas graduadas de vidrio de 1 ml, pero es más práctico usar micropipetas dado que el volumen a dispensar es pequeño.

- Micropipeta automática 10 a 100 µl
- Micropipeta automática 100 a 1000 µl
- Puntas con capacidad de 200 µl, con protección de aerosoles
- Agua destilada estéril
- Tubos plásticos de 0,5 a 1 ml de capacidad, con tapa a presión o rosca
- Gradilla para tubos de 0,5 a 1 ml.

Material biológico a investigar

- Aislamientos de bacilos ácido alcohol resistentes

Si se investigan cultivos desarrollados en medios líquidos, emplearlos directamente

Si se investigan aislamientos obtenidos en medios sólidos, proceder así:

- Tomar con un asa colonias y transferir al tubo plástico
- Agregar, con micropipeta o pipeta, 200 µl de agua destilada estéril o del buffer provisto por el fabricante
- Cerrar y agitar en vortex.

- Cepas control:

Positivo: *M. tuberculosis* H37Ra

Negativo: cepa de referencia de *M. avium*

Reactivos

- Equipo de origen comercial

Procedimiento

Seguir las indicaciones del fabricante. En general, se procede de la siguiente forma:

- Abrir el sobre conteniendo el casete en el momento de uso
- Con micropipeta, colocar 80-100µL de la suspensión bacteriana, o del cultivo en medio líquido en el área A
- Colocar el casete en una bandeja en posición horizontal y dejar en reposo a temperatura ambiente por 15 minutos.

Lectura e interpretación de resultados

No leer después de los 60 minutos de colocado el material a investigar, ya que puede haber cambios en los resultados cuando se seca el soporte.

Aparición de banda en área		Se identifica como
C	D	
si	si	complejo <i>M. tuberculosis</i>
no	si	micobacteria ambiental
--	no	no interpretable

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad

Si el resultado es no interpretable, repetir la prueba. Pudo existir deterioro de los reactivos o errores de procedimiento. Si nuevamente resulta no interpretable, o en caso de dudas por inconsistencia de resultados, realizar otra prueba definitiva (prueba molecular, niacina).

Asegurar siempre la interpretación del resultado observando la morfología y pigmentación de las colonias.



Prueba de sensibilidad a antibióticos e inhibidores químicos

El complejo *M. tuberculosis* está integrado por especies muy relacionadas entre sí: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis* (y la cepa BCG que supuestamente derivó de *M. bovis*), *M. microti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*.

M. tuberculosis, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis* pueden causar TB en el hombre, y BCG puede originar alguna complicación post-vacunal. *M. tuberculosis* es la especie prevalente entre las que originan TB en humanos. *M. bovis* causa TB en varios tipos de animales domésticos y salvajes y puede ser transmitido por ellos al hombre; es posible encontrarlo, particularmente, en individuos con TB dedicados a la cría o procesamiento de productos del ganado bovino. *M. africanum* es un grupo heterogéneo, con propiedades intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, que ha sido aislado mayormente en África ecuatorial. *M. canetti* ha sido aislado muy excepcionalmente. *M. microti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* tienen como hospedadores principales a ciertos animales (roedores, caprinos y focas respectivamente). Sin embargo ha sido descrito algún caso de TB en el hombre originado por *M. microti*, asociado a inmunosupresión.

La diferenciación de la especie dentro del complejo *M. tuberculosis*, no es determinante para la selección del esquema para tratar la TB en humanos, el tratamiento depende principalmente del perfil de sensibilidad del microorganismo frente a los antibióticos. Sin embargo, puede tener interés epidemiológico diferenciar la TB causada por *M. bovis*. Por otra parte, una complicación originada por la vacuna BCG, normalmente, no es tratada con antibióticos, por lo que su diferenciación tiene interés clínico.

Las pruebas de PNB, detección de MPT64 por inmucromatografía lateral, Xpert y los LiPA descritos más adelante, permiten identificar el complejo *M. tuberculosis*, diferenciándolo de las micobacterias ambientales. Pero la distinción de las especies que integran este complejo requieren pruebas adicionales genó o fenotípicas. En particular, el agregado a la PS realizada en LJ de tubos con ciertos antibióticos e inhibidores químicos es útil para resolver la diferenciación entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y BCG. Esto conviene cuando se emplea ese medio para PS y se está frente a un caso de TB con exposición a infección por *M. bovis* o un niño (o más excepcionalmente un adulto) con manifestaciones y antecedentes que indiquen una complicación originada por la vacuna BCG. Así, es posible resolver la mayor parte de las situaciones clínicas en las que surge la duda de que un aislamiento identificado como perteneciente al complejo *M. tuberculosis* no sea de la especie *M. tuberculosis*.

Pruebas útiles para la diferenciación del complejo *M. tuberculosis* y de las especies que lo integran que son más frecuentes en la clínica humana

	Diferenciación del complejo <i>M. tuberculosis</i> del resto de las micobacterias		Diferenciación de las especies del complejo <i>M. tuberculosis</i> más frecuentes en muestras clínicas humanas		
	micobacterias ambientales	complejo <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M bovis</i>	BCG
velocidad de desarrollo	lenta o rápida	lenta			
aspecto macroscópico de la colonia	lisa puede tener pigmentación		rugos no pigmentada	lisa, aplanda no pigmentada	rugosa no pigmentada
aspecto microscópico	BAAR largos y filamentosos o cortos, cocoides, mayormente desagregados	BAAR dispuestos en cuerda			
niacina	negativa		positiva	negativa	negativa/positiva
catalasa a 68°C	positiva	negativa			
reducción de nitrato	negativa/positiva		positiva	negativa	negativa
GeneXpert u otra prueba molecular diseñada para detectar marcadores del complejo <i>M. tuberculosis</i>	negativo	positivo			
detección de MPT64 por inmunocromatografía lateral	negativa	positiva			
Sensibilidad a inhibidores químicos y antibióticos					
PNB	resistente	sensible			
PAS	resistente	sensible (*)			
TCH			resistente	sensible	sensible
cicloserina			sensible (*)	sensible	resistente
Z			sensible (*)	resistente	resistente

PNB : ácido p-nitrobenzoico o ácido 4-nitrobenzoico
 PAS : ácido p-amino salicílico
 TCH : hidracida del ácido tiofeno-2-
 Z : pirazinamida

(*) resultado correspondiente a la cepa salvaje, pero puede hacerse resistente si se la ha expuesto a la acción de la droga

Como se ve en la tabla, es posible identificar rápida y sencillamente el complejo *M. tuberculosis* con una prueba molecular o detectando el Ag MPT64, y luego diferenciar *M. tuberculosis*, *M. bovis* y BCG agregando a la PS realizada en LJ TCH y cicloserina. Las pruebas de niacina y nitrato reductasa pueden sostener los resultados de esas pruebas.

La PS a PAS, TCH y cicloserina en LJ se realizan por el método de las proporciones siguiendo los procedimientos descritos en esta Guía (ver Pruebas

de Sensibilidad a Medicamentos Antituberculosis en Medios Sólidos, Método de las Proporciones, en medio Löwenstein-Jensen). También se describen allí las pruebas con Z y PNB.

Las pruebas de niacina y nitrato reductasa fueron descritas en la parte 2 de este Manual dedicada al Cultivo (ver Identificación de *M. tuberculosis*).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD EN MEDIOS SÓLIDOS

Preparación de suspensiones bacilares madres

A partir de muestras
(para la PS directa)

Material biológico a investigar

Muestra de esputo u otra con BK positiva 2(+) ó 3(+) procesada siguiendo los procedimientos para el cultivo detallados en la parte 2 de este Manual (Cultivo). Las muestras que más comúnmente cumplen con este requisito son las de esputo y biopsias o secreciones ganglionares.

Según el caso, trabajar con:

- el precipitado obtenido luego del proceso de descontaminación de la muestra, si se trata de una muestra que debe ser descontaminada antes de ser sembrada.
- el precipitado obtenido luego de una centrifugación de 15 minutos a 3000 g, si se trata de un líquido con volumen mayor a 3 ml, tomado con asepsia.
- el macerado de una muestra de tejido tomado con asepsia.

Procedimiento

- Suspende el material a investigar en un tubo conteniendo 1 ml de buffer fosfato pH 6,8 rotulado con el número de la muestra.

A partir de aislamientos obtenidos en medios de cultivo

(para la PS indirecta)

Materiales adicionales

Por cultivo a procesar

- 1 botella o tubo de vidrio muy resistente, o de plástico muy transparente, con capacidad para 15-20 ml, con tapa a rosca, conteniendo 5-10 perlas de vidrio, estéril, rotulado con el número de cada aislamiento a investigar.
- Patrón de turbidez Mc Farland 1 o BCG 1mg/ml.

Material biológico a investigar

Aislamientos identificados como *M. tuberculosis*

Procedimiento

Para cultivos en medios sólidos

- Tomar con el asa masa bacilar, procurando tomar material de todas las colonias o napa, evitando arrastrar medio de cultivo. En el caso en que se trate de un aislamiento con desarrollo escaso, tomar masa bacilar de todos los tubos disponibles.
 - Colocar el material en el tubo o frasco con perlas de vidrio. Descartar el asa.
 - Asegurar el cierre de la tapa del tubo o frasco y agitar en vortex hasta disgregar totalmente, comprobando que no queden grumos.
 - Agregar 1 ml de agua destilada estéril.
 - Asegurar el cierre de la tapa del tubo o frasco, y agitar en vortex hasta homogeneizar.
 - Dejar reposar 15 a 30 minutos, para sedimentar grumos y disminuir el riesgo de dispersar aerosoles.
 - Verificar que no queden grumos en el sobrenadante; si se detectan y no pueden ser disgregados repitiendo los dos pasos anteriores, preparar nuevamente la suspensión desde un inicio.
 - Con una pipeta, suavemente, retirar el sobrenadante (sin tocar los grumos que pudieran haber decantado) y transferirlo a un tubo con tapa a rosca. Descartar la pipeta.
 - Agregar agua destilada estéril, poco a poco, hasta que la opacidad se iguale, a simple vista, a la del patrón de turbidez Mc Farland 1 ó BCG 1 mg/ml.
 - Dejar sedimentar al menos 15 minutos antes de proseguir con las diluciones
- Para cultivos en medios líquidos
- Dejar sedimentar el tubo o botella conteniendo el aislamiento durante 15 a 30 minutos.
 - Retirar con una pipeta, aproximadamente 5 ml de la suspensión (sin tocar el sedimento) y transferirla al tubo o frasco con perlas de vidrio. Descartar la pipeta.
 - Asegurar el cierre de la tapa del tubo o frasco y agitar en vortex hasta verificar que la suspensión esté homogénea, sin grumos.
 - Dejar reposar 15 a 30 minutos, para sedimentar grumos y disminuir el riesgo de dispersar aerosoles.
 - Verificar que no queden grumos en el sobrenadante; si se detectan y no pueden ser disgregados repitiendo los dos pasos anteriores, preparar nuevamente la suspensión desde un inicio.
 - Con una pipeta, suavemente, retirar el sobrenadante (sin tocar los grumos que pudieran haber sedimentado en el fondo del tubo o frasco) y transferirlo a un tubo con tapa a rosca. Descartar la pipeta.
 - Agregar agua destilada estéril, poco a poco, hasta que la opacidad se iguale a simple vista a la del patrón de turbidez Mc Farland 1 ó BCG 1 mg/ml.
 - Dejar sedimentar al menos 15 minutos antes de proseguir con las diluciones.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Dilución de las suspensiones bacilares madres

En las siguientes descripciones se emplea la nomenclatura con superíndices para mencionar a las diluciones:

	dilución
10^{-1}	1:10
10^{-2}	1:100
10^{-3}	1:1.000
10^{-4}	1:10.000
10^{-5}	1:100.000
10^{-6}	1:1.000.000

Materiales adicionales

Por PS a realizar

- 6 tubos con tapa a rosca conteniendo 9 ml de agua destilada estéril con los rótulos 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , y 10^{-6} , ordenados en serie en una gradilla, dejando dos lugares antes (uno para ubicar el tubo conteniendo la suspensión madre y otro para correr sistemáticamente cada tubo luego de completada cada dilución, de manera que se eviten errores).

Nota:

Para la PS en medio con agar la dilución 10^{-6} no es necesaria
Para la PS directa, la dilución 10^{-6} no es necesaria y también puede ser innecesaria la 10^{-5} según sea el resultado de la BK (ver más adelante la descripción de la PS directa)

Material biológico

- Suspensiones bacilares madres preparadas con las muestras o aislamientos a investigar mediante PS.

Procedimiento

- Suavemente y sin tocar ningún sedimento que se pudiera observar, transferir con pipeta 1 ml de la suspensión madre al tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 10^{-1} . Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.
- Transferir con pipeta 1 ml del tubo con dilución

10^{-1} al tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 10^{-2} . Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.

- Transferir con pipeta 1 ml del tubo con dilución 10^{-2} al tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 10^{-3} . Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.
- Transferir con pipeta 1 ml del tubo con dilución 10^{-3} al tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 10^{-4} . Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.
- Transferir con pipeta 1 ml del tubo con dilución 10^{-4} al tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 10^{-5} . Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.
- Transferir con pipeta 1 ml del tubo con dilución 10^{-5} al tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 10^{-6} . Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.

Nota:

Para la PS indirecta, las diluciones pueden ser realizadas empleando micropipetas y reduciendo a 4 el número de tubos con agua destilada que es necesario preparar (2 con 9,9 ml y 2 con 9 ml). Proceder de la siguiente forma:

- Transferir 100 microlitros de la suspensión madre a un tubo conteniendo 9,9 ml de agua destilada (dilución 10^{-2}). Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.
- Transferir con pipeta 1 ml de la suspensión dilución 10^{-2} a un tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril (dilución 10^{-3}). Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.
- Transferir 100 microlitros de la dilución 10^{-3} a un tubo conteniendo 9,9 ml de agua destilada (dilución 10^{-5}). Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.
- Transferir con pipeta 1 ml de la suspensión dilución 10^{-5} a un tubo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril (dilución 10^{-6}). Cerrar bien la tapa del tubo. Descartar la pipeta. Agitar con vortex.

Método de las proporciones

Principio

El método desarrollado por Canetti y col, y luego modificado, cuantifica el porcentaje de clones que resisten a la acción de cada droga ensayada, existente en una población de bacilos de *M. tuberculosis* presente en una muestra de un paciente.

En la versión más simplificada, se ensaya una única concentración (crítica) de cada antibiótico. La concentración es seleccionada de forma tal que permita predecir con la mayor certeza posible la actividad de la droga cuando es suministrada en el tratamiento, según lo evaluado clínicamente o por evidencias indirectas.

Empleando un inóculo estandarizado, compara el desarrollo obtenido en medio de cultivo que contiene cada droga con el obtenido en medio sin droga. El aislamiento es clasificado como resistente si el porcentaje de clones que sobrevive a la actividad de la droga es igual o superior al 1%.

Para poder obtener desarrollo suficiente y, a la vez, poder contar colonias, el inóculo es sembrado con 2 diluciones. Cada dilución se siembra en medio sin droga (control) y con cada droga a ensayar. Es conveniente agregar una tercera dilución para sembrar solamente el medio sin droga. Esta tercera dilución permite contar colonias cuando el inóculo ha resultado alto y así evitar repeticiones. El inóculo debe ser muy homogéneo y las diluciones y volúmenes sembrados deben ser exactos para que los cálculos que se hagan sean correctos.

Los medios con agar permiten acelerar y visualizar antes el desarrollo y, por lo tanto, tienen una incubación menos prolongada que los medios a base de huevos.

Nota

En cada caso, se seleccionarán los tubos con drogas necesarios según el algoritmo de trabajo adoptado. Por ejemplo, se seleccionaran tubos con I y R para

el *screening* inicial de pacientes, y tubos con S, E, la quinolona, el/los inyectables y otras drogas empleados en los esquemas de segunda línea, para los casos en los que ya se haya detectado resistencia a I y/o R. Los medios de cultivo a emplear deben pertenecer a un mismo lote, perfectamente identificado con su número, con la droga que contiene cada tubo (en el caso en que no sea control sin droga). El lote debe haber sido sometido a control de calidad.

En medio Löwenstein-Jensen

Inoculación e incubación

Método directo

Por muestra a investigar

Material biológico

- Las diluciones realizadas con la suspensión obtenida de la muestra descontaminada, seleccionadas según haya sido el resultado de la BK, como se presenta a continuación:

Resultado de la BK de la muestra a investigar	diluciones de la suspensión madre a inocular		
	I	II	III
(++)	10^{-1}	10^{-3}	10^{-4}
(+++)	10^{-2}	10^{-4}	10^{-5}

Medio de cultivo

Seleccionar y rotular los tubos con el número de la PS correspondiente y las diluciones a sembrar (según el resultado que haya tenido la BK) como se indica a continuación:

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Resultado de la BK de la muestra a investigar	Tubos con medio de cultivo rotulados con el numero de la muestra y la dilución				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
(++)	2 tubos sin droga 1 tubo con cada droga a investigar		2 tubos sin droga 1 tubo con cada droga a investigar	2 tubos sin droga	
(+++)		2 tubos sin droga 1 tubo con cada droga a investigar		2 tubos sin droga 1 tubo con cada droga a investigar	2 tubos sin droga

Identificar la fecha de realización de la PS. Esto puede ser hecho en los tubos control (sin droga) o, si el número de PS a realizar es elevado, en la bandeja y contenedor donde luego se ubicará cada prueba durante la incubación.

Ordenar los tubos ubicando en una gradilla, en serie, cada dilución a sembrar y los tubos con medio correspondientes a esa dilución. Dejar un lugar libre al inicio para desplazar sistemáticamente cada tubo luego de sembrado, de manera que se eviten omisiones o doble siembra en un mismo tubo.

Material adicional

- Una placa de Petri o un paño absorbente desechable.
- Una bandeja o charola con una varilla de vidrio u otro sostén, o gradillas que permitan incubar los tubos inclinados (con la boca del tubo elevado aproximadamente 15 °).

Procedimiento

Al realizar los siguientes pasos observar las siguientes precauciones:

- descartar con movimiento enérgico el exudado acuoso que le pueda haber quedado en cada tubo con LJ luego de la coagulación , sobre una placa de Petri abierta o un paño absorbente, sin tocar ninguna superficie con la boca del tubo,
- no abrir un tubo sin haber cerrado el anterior.

Proceder de la siguiente forma para cada PS:

- Tomar el primer tubo con medio a sembrar, abrir la tapa,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,2 ml de la dilución I en cada uno de los tubos rotulados con esta dilución (2 tubos LJ sin droga, y un tubo con cada droga a investigar) Descartar la pipeta,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,2 ml de la dilución II en cada uno de los tubos rotulados con esta dilución (2 tubos LJ sin droga, y un tubo con cada droga a investigar) Descartar la pipeta,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,2 ml de la dilución III en cada uno de los tubos rotulados con esta dilución (2 tubos LJ sin droga),
- Tomar el primer tubo sembrado, distribuir suavemente la suspensión sembrada sobre toda la superficie del medio, haciendo un movimiento rotatorio suave,
- Verificar el cierre de la tapa del tubo sin apretarla, inclinar de inmediato en una bandeja o en una gradilla elevando la parte superior del tubo aproximadamente 15°. Asegurar que el tubo no rote luego de ubicado,
- Completar los dos pasos anteriores con todos los tubos sembrados,
- Incubar a 37° C.

Método indirecto

Por aislamiento a investigar
Material biológico

- Las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , y 10^{-6} previamente preparadas con las suspensión madre obtenida a partir de un cultivo positivo de M. tuberculosis.

Medio de cultivo

	Tubos a sembrar (rotulados con el número de PS y dilución)		
	I	II	III
	10^{-3}	10^{-5}	10^{-6}
LJ sin droga (controles)	2	2	2
LJ con cada droga a investigar	1	1	--

- Ordenar los tubos ubicando en una gradilla, en serie, cada dilución a sembrar y los tubos con medio correspondientes a esa dilución. Dejar un lugar libre al inicio para ir desplazando sistemáticamente cada tubo luego de sembrado, de manera que se eviten omisiones o doble siembra en un mismo tubo,
- Identificar la fecha de realización de la PS. Esto puede ser hecho en los tubos control o, si el número de PS a realizar es elevado, en la bandeja y caja o contenedor donde luego se ubicará cada prueba durante la incubación.

Materiales adicionales

- Una placa de Petri
- Una bandeja o charola con una varilla de vidrio u otro sostén, o gradilla que permita incubar los tubos inclinados (con la boca del tubo elevado aproximadamente 15°).

Procedimiento

Al realizar los siguientes pasos observar las siguientes precauciones:

- descartar con movimiento energético el exudado acuoso que le pueda haber quedado en cada tubo con LJ luego de la coagulación, sobre una placa de Petri abierta o un paño absorbente, sin tocar ninguna superficie con la boca del tubo,
- no abrir un tubo sin haber cerrado el anterior.

Proceder de la siguiente forma para cada PS

- Con pipeta sembrar exactamente 0,2 ml de a dilución 10^{-3} en cada uno de los tubos rotulados con esta dilución (2 tubos LJ sin droga, y un tubo con cada droga a investigar) Descartar la pipeta,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,2 ml de a dilución 10^{-5} en cada uno de los tubos rotulados con esta dilución (2 tubos LJ sin droga, y un tubo con cada droga a investigar) Descartar la pipeta,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,2 ml de a dilución 10^{-6} en cada uno de los tubos rotulados con esta dilución (2 tubos LJ sin droga). Descartar la pipeta,
- Tomar el primer tubo, distribuir suavemente la suspensión sembrada sobre toda la superficie del medio,
- Verificar el cierre de la tapa del tubo sin apretarla, inclinar de inmediato en una bandeja o en una gradilla elevando la parte superior del tubo aproximadamente 15° . Asegurar que el tubo no rote luego de ubicado,
- Completar la operación anterior con todos los tubos sembrados,
- Incubar a $37^\circ C$.

Inspección inicial de los tubos

Procedimiento

- Inspeccionar los tubos cada dos días hasta verificar que la suspensión inoculada ha sido absorbida por el medio.

En ese momento:

- Ajustar la tapa a rosca de cada tubo,
- Si el espacio es limitado en la estufa de cultivo, poner los tubos en posición vertical en cajas, agrupando en forma ordenada cada dilución y PS,
- Identificar, registrar y descartar cualquier tubo que evidencie contaminación,
- En el caso en que se registre contaminación extendida en una PS que inhabilite su posterior lectura, disponer que se informe de inmediato

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

ese hallazgo, que se repita la PS si existe otro tubo con el aislamiento en buenas condiciones, o se solicite nuevo material siempre que sea posible. Descartar los tubos contaminados.

Lectura y registro de resultados

Materiales adicionales

- Contador manual de personas o ganado (opcional)
- Lupa (opcional)

Procedimiento

- Realizar dos lecturas
a los 20-22 días (3 semanas)
a los 40-42 días (6 semanas)
- Si, excepcionalmente, se detectan tubos que tengan agua no absorbida en la parte inferior, mantenerlos en posición vertical durante la lectura, para evitar que el agua repique las colonias que ya han desarrollado por arrastre,
- Examinar el desarrollo y comprobar que no existen anomalías (contaminación o aspecto diferente de *M. tuberculosis*),
- Contar las colonias que se presentan separadas. Puede emplearse la lupa y el contador manual para facilitar este proceso. No contar las colonias que sólo crecen sobre el pico de flauta o bordes delgados del medio de cultivo en los tubos con droga, ya que allí la droga puede estar inactivada,
- Registrar los resultados de la siguiente forma:

Desarrollo observado	Registrar
0-100 colonias, separadas	el numero de colonias
100-200 colonias separadas	2+ (numero aproximado de colonias)
Más de 200 colonias separadas	2+
Napa desarrollo confluyente	3+

Al finalizar la tercera semana de incubación, proceder según se indica a continuación:

Observación	Procedimiento
desarrollo en algun tubo con droga	si ese desarrollo es igual o mayor al 1% de lo inoculado en los tubos controles (ver Cálculo e Interpretación de resultados,más abajo). Si es mayor, informar de inmediato la resistencia a la droga. el informe de los resultados correspondientes a la(s) droga(s) para las que no se observe resistencia aún, deberá aguardar hasta las 6 semanas dado que podrían desarrollar clones resistentes en los días posteriores
desarrollo escaso en los tubos control sembrados con la dilución I (20 colonias o menos)	disponer que se repita de inmediato la PS porque existe alto riesgo de que no se alcance el desarrollo necesario para interpretar los resultados de la prueba
ninguna de las situaciones anteriores	prolongar la incubación hasta las 6 semanas

- Al finalizar la 6ta semana de incubación, registrar, analizar e interpretar los resultados según se indica abajo (ver Verificación de la calidad de la prueba y Cálculos e interpretación de los resultados).

En medio Middlebrook 7H₁₀

Inoculación e incubación

Método directo

Material biológico

- Las diluciones realizadas a partir de la muestra descontaminada, seleccionadas según haya sido el resultado de la BK como se presenta a continuación:

Resultado de la BK de la muestra a investigar	diluciones de la suspensión madre a inocular		
	I	II	III
(++)	· 10 ⁻¹	· 10 ⁻³	· 10 ⁻⁴
(+++)	· 10 ⁻²	· 10 ⁻⁴	· 10 ⁻⁵

Medio de cultivo

- Placas de Petri preparadas con el agar sin droga y con cada una de las drogas a ensayar. Rotularlas con el número de la muestra y las diluciones a sembrar en cada cuadrante (según el resultado que haya tenido la BK).

Material adicional

- Bolsas plásticas permeables al CO₂ de tamaño adecuado para contener una placa de Petri con medio de cultivo.

Equipo adicional

- Incubadora a 37°C con atmósfera de 5–10% de CO₂,
- Selladora por calor de bolsas plásticas.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Procedimiento

- Ordenar los tubos conteniendo las diluciones de cada muestra en serie en una gradilla,
- Ordenar las placas siguiendo la misma secuencia,
- Al abrirlas cuidar que la parte interior de la tapa no toque ninguna superficie,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,1 ml de la dilución I en los cuadrantes control (sin droga) y en cada uno de los cuadrantes conteniendo las drogas a ensayar rotulados con la dilución I. Descartar la pipeta,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,1 ml de a dilución II en el cuadrante control (sin droga) y en cada uno de los cuadrantes conteniendo las drogas a ensayar rotulados con la dilución II. Descartar la pipeta,
- Mover suavemente las placas para distribuir la siembra en la superficie del medio,
- Colocar las placas sobre bandejas en posición horizontal. Dejar a temperatura ambiente hasta que se absorba la siembra y no se observe condensación de humedad sobre la tapa,
- Con una cinta adhesiva, asegurar la unión de la tapa y base de cada placa,
- Colocar cada placa dentro de una bolsa plástica y sellarla,
- Acondicionar las placas nuevamente en cajas o bandejas,
- Incubar a 37° C en estufa con atmósfera de 5–10% de CO₂.

Método indirecto

Material biológico

- Diluciones 10⁻² (dilución I) y 10⁻⁴ (dilución II) previamente preparadas a partir de la suspensión madre de cada cultivo positivo de *M. tuberculosis* a investigar.

Medios de cultivo

- Seleccionar las placas de Petri preparadas con el agar sin droga y con las drogas a ensayar. Rotularlas con el número de la PS y las diluciones a sembrar en cada cuadrante.

Procedimiento

- Ordenar los tubos conteniendo las diluciones de cada muestra en serie en una gradilla,
- Ordenar las placas siguiendo la misma secuencia,
- Al abrirlas cuidar que la parte interior de la tapa no toque ninguna superficie,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,1 ml de la dilución 10⁻² en los cuadrantes control (sin droga) y en cada uno de los cuadrantes conteniendo las drogas a ensayar rotulados con la dilución 10⁻². Descartar la pipeta,
- Con pipeta sembrar exactamente 0,1 ml de a dilución 10⁻⁴ en el cuadrante control (sin droga) y en cada uno de los cuadrantes conteniendo las drogas a ensayar rotulados con la dilución 10⁻⁴. Descartar la pipeta (*),
- Mover suavemente las placas para distribuir la siembra en la superficie del medio,
- Colocar las placas sobre bandejas en posición horizontal. Dejar a temperatura ambiente hasta que se absorba la siembra y no se observe condensación de humedad sobre la tapa,
- Con una cinta adhesiva, asegurar la unión de la tapa y base de cada placa,
- Colocar cada placa dentro de una bolsa plástica y sellarla,
- Acondicionar las placas nuevamente en cajas o bandejas,
- Incubar a 37° C en estufa con atmósfera de 5–10% de CO₂.

(* Nota: Es recomendable sembrar también la dilución 10⁻⁵ en un cuadrante de medio sin droga para incrementar las posibilidades de contar las colonias con precisión.

Inspección inicial de las placas

Procedimiento

- Inspeccionar las placas durante un periodo de 2 a 7 días posteriores a la siembra, sin sacarlas de sus bolsas,
- Identificar, registrar y cualquier placa que evidencie contaminación,
- En el caso en que se registre contaminación extendida en una PS que inhabilite su posterior

lectura, disponer que se informe de inmediato ese hallazgo y se solicite nuevo material siempre que sea posible.

Nota: es conveniente agregar una segunda inspección al finalizar la segunda semana y proceder según se indica a continuación.

Observación	Procedimiento
desarrollo en algun cuadrante con droga	calcular en ese momento si ese desarrollo es igual o mayor al 1% de lo inoculado en los cuadrantes controles (ver Calculo e interpretacion de resultados,más abajo). Si es mayor, informar de inmediato la resistencia a la droga. el informe de los resultados correspondientes a la(s) droga(s) para las que no se observe resistencia aún, deberá aguardar hasta las 3 semanas dado que podrían desarrollar clones resistentes en los días posteriores
desarrollo escaso en los cuadrantes control sembrados con la dilución I (20 colonias o menos)	disponer que se repita de inmediato la PS porque existe alto riesgo de que no se alcance el desarrollo necesario para interpretar los resultados de la prueba
ninguna de las situaciones anteriores	prolongar la incubación hasta las 6 semanas

Lectura y registro de resultados

Equipo adicional

- Lupa o microscopio de disección

Procedimiento

- Realizar la lectura final a los 21 días (3 semanas) de incubación.
- Examinar cada placa bajo la lupa o microscopio, sin sacarlas de las bolsas.
- Examinar el desarrollo y comprobar que no existen anomalías (aspecto diferente de *M. tuberculosis*).
- Contar las colonias que se presentan separadas.
- Registrar los resultados de la siguiente forma:

Desarrollo observado	Registrar
0–50 colonias	el numero de colonias
50–100 colonias	1+ (y el numero de colonias)
100–200 colonias	2+ (y numero aproximado de colonias)
200–500	3+
Napa desarrollo confluyente	4+

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Verificación de la calidad de la prueba

- Comprobar si se cumplen las siguientes condiciones:
 1. buena calidad del medio con y sin droga utilizado, según los resultados del control de calidad realizado con las cepas de referencia (ver capítulo de Gestión de calidad),
 2. suficiente desarrollo (al menos 100 colonias) en los tubos o cuadrantes control sembrado con la dilución I,
 3. colonias separadas y contables en el tubo o cuadrante control con al menos una de las otras diluciones sembradas,
 4. correlación entre el número de colonias desarrolladas y las diluciones sembradas.

La condición 1 es indispensable.

La condición 2 es necesaria cuando no se detecta desarrollo en el medio con droga, porque es posible que no se le haya dado oportunidad a desarrollar a los clones resistentes a esa droga por ser escaso el inóculo.

La condición 3 es necesaria cuando se detecta desarrollo en el medio con droga porque es necesario calcular si ese desarrollo es igual, mayor o menor al 1% del inóculo.

La condición 4 es necesaria para poder inferir a partir de las colonias que desarrollan con una dilución, las desarrolladas con otra dilución, siguiendo el siguiente razonamiento:

Si, por ejemplo, en LJ se han sembrado las siguientes diluciones denominadas I, II y III.

PS	material procesado	Diluciones sembradas		
		I	II	III
Directa	muestra BK (++)	$\cdot 10^{-1}$	$\cdot 10^{-3}$	$\cdot 10^{-4}$
	muestra BK (+++)	$\cdot 10^{-2}$	10^{-4}	$\cdot 10^{-5}$
Indirecta	aislamiento	$\cdot 10^{-3}$	10^{-5}	$\cdot 10^{-6}$

La dilución II está diluida 1:100 con relación a la I, y la dilución III está diluida 1:1000 con relación a la I.

Entonces a simple vista:

- los tubos con dilución I deben mostrar desarrollo aproximadamente 100 veces mayor que los que tienen la dilución II y aproximadamente 1000 veces mayor que los que tienen la dilución III,
- los tubos con la dilución II deben mostrar desarrollo aproximadamente 10 veces mayor que los de la dilución III.

Normalmente, con buena calidad de trabajo, se cumplen las 4 condiciones, se observa desarrollo confluyente en los tubos control inoculados con la

dilución I y colonias contables en los tubos control correspondientes a la dilución II. En ese caso se puede proceder a realizar los cálculos, interpretar e informar todos los resultados.

Si se cumple la condición 1, pero no se cumplen las condiciones 2, 3 y/o 4 se deberá repetir las PS. Excepcionalmente podrán interpretarse e informar algunos de los resultados según se describe más adelante.

Cálculos e interpretación de resultados

Este último paso debe ser realizado por personal muy formado, cuidadoso y experimentado para tomar las decisiones correctas en base a los resultados registrados y para asegurar la calidad del informe.

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad

- Si se ha verificado la calidad de la PS y no se ha observado desarrollo en ninguno de los tubos o cuadrantes conteniendo drogas, informar que el aislamiento es sensible a las drogas ensayadas. En este caso el inóculo excesivo no inhabilita la interpretación de la prueba dado que no es necesario contar colonias.
 - Si se visualizan colonias en uno o varios tubos o cuadrantes conteniendo droga, en la primera o segunda lectura, es necesario calcular si esas colonias constituyen más o menos del 1% del inóculo sembrado. En este caso debe ser posible contar colonias para hacer el cálculo correspondiente.
- Para esto, seguir la siguiente secuencia:
- Promediar el número de los dos tubos cuadrantes control de cada dilución en las que se pudo hacer el conteo (es decir, en tubos con colonias separadas y contables),
 - Con base en el promedio obtenido en el paso anterior, estimar el inóculo sembrado con cada dilución, de la siguiente forma.

situación	colonias observadas en tubos o cuadrantes control sembrados con la dilución			promediar las colonias contadas en los dos tubos o cuadrantes control sembrados con la dilución	Procedimiento	
	I	II	III		Estimación del inóculo sembrado	
					con la dilución I	con la dilución II
1	contables			I	el promedio obtenido	
2 (frecuente)	incontables	contables		II	promedio obtenido con dilución II multiplicado por 100	promedio obtenido con dilución II
3 (infrecuente)	incontables	incontables	contables	III	promedio obtenido con dilución III multiplicado por 1000	promedio obtenido con dilución III multiplicado por 10

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

- Contar o estimar las colonias desarrolladas con cada droga ensayada, con cada dilución sembrada, de la siguiente forma:

situación	colonias observadas en el cuadrante con droga sembrado con la dilución		Estimación del numero de colonias que desarrollaron	
	I	II	con la dilución I	con la dilución II
1	contables	escasas o ninguna	numero de colonias contadas con la dilucion I	
2	incontables	contables	numero de colonias contadas con la dilución II multiplicado por 100	numero de colonias contadas con la dilucion II

- Tomando los cálculos correspondientes a una dilución, calcular el porcentaje que representa el número de colonias desarrollado en el medio con droga con respecto al inóculo promedio correspondiente a esa misma dilución (ver ejemplos más adelante),
- Si ese porcentaje de clones que han desarrollado en el medio con droga es mayor al 1% clasificar el resultado como “resistente”, y si es menor como “sensible”.
- Si al hacer la verificación de la calidad de la PS no se ha cumplido la condición 2, ó 3 ó 4 solo se podrán informar algunos resultados en las siguientes situaciones:

Se cumple la condición

1	2	3	4	Inóculo	Conducta a seguir
si	no	si	si	insuficiente	Informar la resistencia a las drogas con las que han crecido más del 1% de clones resistentes. Repetir la PS para el resto de las drogas
si	si	no	si	excesivo	Informar la sensibilidad a las drogas para las que se registró ausencia de desarrollo con todas las diluciones sembradas Repetir la PS con las drogas con las que se registró desarrollo
si	si	si	no	mal diluido	Informar la sensibilidad a las drogas con las que se registró ausencia de desarrollo con todas las diluciones sembradas Repetir la PS con las drogas para las que se registró desarrollo
si	no	si	no	insuficiente y mal diluido	Repetir toda la PS

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad

Se resumen a continuación los informes que pueden ser liberados en el momento de realizar cada lectura:

PS	Requisitos Tubo con droga	Informe de resultado
Cumple condiciones 1, 2, 3 Puede o no cumplir la condición 4	ausencia de desarrollo o desarrollo menor al 1% con relación al control finalizados las 3 semanas de incubación en agar 7H10 o las 6 semanas en LJ	Sensible
Cumple condiciones 1, 2 y 4 Puede o no cumplir la condición 3	ausencia de desarrollo finalizados las 3 semanas de incubación en agar 7H10 o las 6 semanas en LJ	Sensible
Cumple condiciones 1, 3 y 4 Puede o no cumplir la condición 2	desarrollo mayor al 1% del inóculo en el momento en que se detecte	Resistente

Cuando se registra un resultado borderline (es decir el desarrollo de clones resistentes en una proporción menor pero cercana al 1%), proceder de la siguiente forma:

- si se trata de rifampicina, prolongar la incubación una semana (para ver si se evidencia el desarrollo de mutantes resistentes que demoran un poco más para multiplicarse),
- en todos los casos, repetir la PS con la(s) droga(s) que arrojen ese resultado; si ya hubiera disponible otro cultivo positivo del mismo paciente, preferir el nuevo cultivo,
- informar el médico que se ha registrado ese resultado.

Los siguientes ejemplos pueden facilitar la interpretación de resultados:
Prueba de sensibilidad realizada en medio Löwenstein Jensen

Ejemplo1

Nº xxxxx		Lote de medio xxx		Responsable de la PS xxxx					
Muestra de esputo BK 3+									
Fecha de siembra xxxx									
Lectura 21 días Fecha xxx	sembradas		lectura						
	(*)	(**)	controles			isoniacida		rifampicina	
			Tubo 1	Tubo 2	Promedio		%		%
	I 10 ⁻²		++	++	150	65	43,3	5	3,3
	II 10 ⁻⁴	1/100	1	2	1,5	0		0	
III 10 ⁻⁵	1/1000	0	0		resistente		resistente		

(*) con relacion a la suspensión madre

(**) con relacion a la dilucion I

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

A los 21 días (primera lectura)

Las colonias pudieron ser contadas con la dilución II (en este caso 10⁻⁴ de la suspensión madre preparada directamente con la muestra), y a partir de ella se estimó el desarrollo observado con la dilución I:

Promedio de colonias desarrolladas con la dilución II

$$\text{en los tubos control} = (1+2) / 2 = 1,5$$

Estimación del promedio de colonias desarrolladas con la dilución I

$$\text{en los tubos control} = 1,5 \times 100 = 150$$

En ese momento ya se observaron 65 colonias en el tubo con isoniacida, lo que representa el siguiente porcentaje con relación al inóculo:

$$65 \times 100 / 150 = 43,3\%$$

El desarrollo es superior al 1% del inóculo, se clasifica como Resistente a I.

También se observaron 5 colonias o en el tubo con R que representa el siguiente porcentaje:

$$5 \times 100 / 150 = 3,3\%$$

El desarrollo es superior al 1% del inóculo, se clasifica como RR.

El aislamiento es multiresistente.

Se informa de inmediato, sin aguardar hasta los 42 días. Y también de inmediato se dispone hacer PS a E y drogas de segunda línea, tomando material de los tubos control.

Esta segunda prueba tuvo los siguientes resultados:

Nº xxxxx : Lote de medio xxx Responsable de la PS xxx															
Fecha de siembra xxx															
Lectura 21 días Fecha xxx	Diluciones sembradas (*) (**)		lectura												
			Controles		Promedio	E		S		K		A		C	
	Tubo 1	Tubo 2		%			%		%		%		%		%
	I 10 ⁻³		65	43	54	0		0		0		0		0	
II 10 ⁻⁵	1/100	0	0		0		0		0		0		0		0
III 10 ⁻⁶	1/1000	0	0												

Nº xxxxx : Lote de medio xxx Responsable de la PS xxx															
Fecha de siembra xxx															
Lectura 42 días Fecha xxx	Diluciones sembradas (*) (**)		lectura												
			Controles		Promedio	E		S		K		A		C	
	Tubo 1	Tubo 2		%			%		%		%		%		%
	I 10 ⁻³		++	++	200	0		0		0		0		0	
II 10 ⁻⁵	1/100	3	1	2	0		0		0		0		0		0
III 10 ⁻⁶	1/1000	0	0		sensible		sensible		sensible		sensible		sensible		sensible

(*) con relación a la suspensión madre
(**) con relación a la dilución I

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad

Primera lectura (21 días):

No se observa desarrollo en ninguno de los tubos con drogas. Pero este resultado no puede ser informado. Por un lado el inóculo en los controles aún no ha alcanzado el mínimo requerido de 100 colonias, por otro lado aún es posible que aparezcan clones resistentes en lo que resta de incubación.

Estimación del promedio de colonias desarrolladas con la dilución I
en los tubos control = $2 \times 100 = 200$

Es decir que se ha superado el desarrollo mínimo requerido.

No se ha observado ninguna colonia en los tubos con drogas.

Lectura final (42 días):

Las colonias de los controles pudieron ser contadas en la dilución II (10⁻⁵ de la suspensión madre)

Se clasifica al aislamiento como sensible a E, estreptomycin, K, A, C y la FQN ensayada. La selección de estas drogas se hizo considerando los esquemas de segunda línea empleados en el país.

Promedio de colonias desarrolladas con la dilución II
en los tubos control = $(3+1)/2 = 2$

Ejemplo 2

Aislamiento N° xxx		Lote de medio xxx		Responsable de la PS		xxx			
Fecha de siembra		xxxx							
Lectura 21 días Fecha xxx	sembradas		lectura						
	(*)	(**)	controles			isoniacida		rifampicina	
			Tubo 1	Tubo 2	Promedio		%		%
	I 10 ⁻³		25	40		0		0	
	II 10 ⁻⁵	1/100	0	0		0		0	
III 10 ⁻⁶	1/1000	0	0						

Aislamiento N° : Lote de medio xxx		Responsable de la PS		xxx					
Fecha de siembra: xxx		xxxx							
Lectura 42 días Fecha xxx	sembradas		lectura						
	(*)	(**)	controles			isoniacida		rifampicina	
			Tubo 1	Tubo 2	Promedio		%		%
	I 10 ⁻³		48	130		0		0	
	II 10 ⁻⁵	1/100	14	0		0		0	
III 10 ⁻⁶	1/1000	0	0		no interpret		no interpret		

(*) con relacion a la suspensión madre

(**) con relacion a la dilucion I

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Primera lectura (21 días):

No se observa desarrollo en ninguno de los tubos con drogas. Pero este resultado no puede ser informado. Por un lado el inóculo en los controles aún no ha alcanzado el mínimo requerido de 100 colonias, por otro lado aún es posible que aparezcan clones resistentes en lo que resta de incubación.

Lectura final (42 días):

Las colonias contadas en los tubos control evidencian que el inóculo no ha sido homogéneo. Efectivamente, los dos tubos sembrados la dilución I (10⁻³) tienen un número de colonias que son muy

diferentes entre sí. Lo mismo sucede con los dos tubos sembrados con la dilución II (10⁻⁵). Además el número de colonias desarrolladas con la dilución 10⁻³ no parece ser aproximadamente 100 veces mayor a las desarrolladas con la dilución 10⁻⁵. De manera que no se puede calcular ni promedios ni porcentajes. Se informa " No interpretable" y se dispone la repetición de la prueba.

Esto implica un retraso muy importante y perjuicio para el paciente que no tendrá una orientación oportuna para su tratamiento. Por eso es muy importante extremar los cuidados y precisión en los procedimientos de la PS.

Ejemplo 3

Aislamiento N° xxxxx		Lote de medio xxx		Responsable de la PS xxx																		
Antecedente : resistente a I R S																						
Fecha de siembra xxxxx																						
Lectura 21 días		lectura																				
Fecha xxx	Diluciones sembradas		Controles		Promedio	I		R		E		S		K		A		C		FQN		
	(*)	(**)	Tubo 1	Tubo 2			%		%		%		%		%		%		%		%	
I	10 ⁻³		~125	'++		'++		'++		0		0		0		0		0		cont		78
II	10 ⁻⁵	1/100	15	29	22	2	9,09	7	31,8	0		0		0		0		0			1	4,5
III	10 ⁻⁶	1/1000	0	0		resistente		resistente														resistente

Aislamiento N° xxxxx		Lote de medio xxx		Responsable de la PS xxx																	
Antecedente : resistente a I R S																					
Fecha de siembra xxxxx																					
Lectura 42 días		lectura																			
Fecha xxx	Diluciones sembradas		Controles		Promedio	I		R		E		S		K		A		C		FQN	
	(*)	(**)	Tubo 1	Tubo 2			%		%		%		%		%		%		%		%
I	10 ⁻³		'+++	'+++	6000	'+++		'+++		8(***)		0		'+++		0		descartado		'+++	
II	10 ⁻⁵	1/100	49	71	60	35	58,3	83	138	1(***)		0		2	3,33	0		0		39	65
III	10 ⁻⁶	1/1000	3	8	5,5	resistente		resistente		sensible		Inconsist		resistente		sensible		NI			resistente

(*) con relacion a la suspensión madre
(**) con relacion a la dilucion I

(***) sólo en el pico de flauta

Se ha investigado el aislamiento de un paciente con diagnóstico de TB MDR, más precisamente con una PS anterior se determinó que era resistente a I, R y S. Por lo tanto, desde un inicio se ensayan drogas de primera y segunda línea.

A los 21 días (primera lectura):

Las colonias pudieron ser contadas con la dilución II (en este caso 10⁻⁵ de la suspensión madre preparada con el aislamiento)

Promedio de colonias desarrolladas con la dilución II en los tubos control = (15+29) / 2= 22

Con la misma dilución ya se observaron 2 colonias en el tubo con isoniacida, lo que representa el siguiente porcentaje con relación al inóculo

$$2 \times 100 / 22 = 9,1\%$$

El desarrollo es superior al 1% del inóculo, se clasifica como Resistente a I.

También se observaron, con la misma dilución II, 7 colonias o en el tubo con R que representa el siguiente porcentaje

$$7 \times 100 / 22 = 31,8\%$$

El desarrollo es superior al 1% del inóculo, se clasifica como RR.

Con la FQN se observó 1 colonia lo que representa el siguiente porcentaje del inóculo

$$1 \times 100 / 22 = 4,5 \%$$

El desarrollo es superior al 1% del inóculo, se clasifica como Resistente a la FQN ensayada.

La dilución I confirma las resistencias detectadas con la dilución II

Se detecta contaminación en un tubo con C sembrado con la dilución I:

Se emite de inmediato el informe confirmando la multiresistencia y la resistencia agregada a la FQN.

En ese mismo momento se dispone que se haga PS a una quinolona de más reciente generación entre las empleadas por el Programa de Control de TB y la repetición de la PS a C, dado que esta información es importante para este paciente que, hasta este momento, es clasificado con TB al menos pre XDR.

A los 42 días (lectura final):

Las colonias pudieron ser contadas con las diluciones II y III (10^{-5} y 10^{-6} de la suspensión madre preparada con el aislamiento).

Promedio de colonias desarrolladas con la dilución III

$$\text{en los tubos control} = (3+8) / 2 = 5,5$$

Promedio de colonias desarrolladas con la dilución II

$$\text{en los tubos control} = (49+71) / 2 = 60$$

Estimación de las colonias desarrolladas con la dilución I = $60 \times 100 = 6000$

El desarrollo es muy abundante, la relación entre

el número de colonias contadas con las distintas diluciones es buena, y se ha podido contar o estimar el desarrollo de colonias.

No se observaron colonias con A. Se clasifica como Sensible a A.

Tampoco se observaron colonias con S, por lo que el aislamiento también sería sensible a esa droga. Sin embargo, el paciente tiene registrada resistencia a S con anteriores aislamientos. El resultado no es consistente y por lo tanto se informa esta situación y se repite la PS a esta droga, preferentemente con otro aislamiento del paciente.

En los tubos con E se observaron algunas colonias con las diluciones I y II. Pero estas colonias crecieron sólo en el pico con flauta y no en el resto de la superficie. No se considera este desarrollo porque en la zona más delgada del medio de cultivo la droga seguramente se ha inactivado.

Con la dilución II se observaron 35 colonias en el tubo con I, 83 con R 2 con K y 39 con la FQN ensayada. En este caso se pueden calcular los porcentajes directamente con relación al inóculo promedio de los tubos control correspondiente a la misma dilución II.

Cálculo

$$35 \times 100 / 60 = 58,3\%$$

$$83 \times 100 / 60 > 100\%$$

$$2 \times 100 / 60 = 3,3\%$$

$$39 \times 100 / 60 = 65\%$$

En los tres casos el desarrollo es superior al 1% del inóculo, se confirma la MDR que ya había sido diagnosticada, y se clasifica como Resistente a K y a la FQN ensayada. Se ha extendido la resistencia y el paciente padece de TB XDR.

En este mismo momento se puede revisar la PS a S, C y a la FQN de más reciente generación hecha 21 días atrás, para ver si se detecta resistencia precozmente. En este caso crítico es importante agilizar en todo lo posible los informes.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Prueba de sensibilidad realizada en medio Middlebrook 7H10

Ejemplo 1

Muestra N° xxx Lote de medio xxx Responsable de la PS xxxx							
BK 2+							
Fecha de siembra xxxx							
Lectura 21 días Fecha xxxx	Diluciones sembradas		lectura cuadrantes				
	(*)	(**)	control	isoniacida		rifampicina	
					%		%
	I 10 ⁻¹		2+ (~150 col)	1	0,7	0	
	II 10 ⁻³	1/100	0	0		0	
			sensible		sensible		

Las colonias no pudieron ser contadas con precisión en el cuadrante control, pero visualmente fueron estimadas en 150 con la dilución I (en este caso 10⁻¹ de la suspensión madre preparada con la muestra descontaminada).

Con esa misma dilución, se observó una colonia en el cuadrante con isoniacida. El porcentaje con relación al control sería:

$$1 \times 100 / 150 = 0,7 \% \text{ (aproximadamente)}$$

El porcentaje es menor al 1% con certeza porque el cuadrante control tiene más de 100 colonias, aun

cuando no pudo ser contado con precisión. Por lo tanto se clasifica al aislamiento como Sensible a I.

El porcentaje fue menor del 1% pero cercano a ese límite. Ante este resultado es conveniente recomendar al médico la repetición de la PS en el próximo control del paciente, con una nueva muestra, para verificar si no se ha elevado el porcentaje de clones resistentes.

No se observó desarrollo en el cuadrante con R, el aislamiento se clasifica como sensible a R.

Ejemplo 2

Aislamiento xxx Lote de medio xxx Responsable de la PS xxxx							
Fecha de siembra xxxx							
Lectura 21 días Fecha xxxx	Diluciones sembradas		lectura cuadrantes				
	(*)	(**)	control	isoniacida		rifampicina	
					%		%
	I 10 ⁻²		4+	1+ (108 col)		2	
	II 10 ⁻⁴	1/100	54	35	64,8	0	
			resistente		sensible		

(*) con relacion a la suspensión madre

(**) con relacion a la dilucion I

El porcentaje de colonias desarrollado con isoniacida puede ser calculado considerando el conteo correspondiente a la dilución II.

$$35 \times 100 / 54 = 64,8 \%$$

El desarrollo es superior al 1% del inóculo, se clasifica al aislamiento como resistente a I.

El porcentaje de colonias desarrollado con R debe ser calculado con la dilución I.

Estimación de las colonias desarrolladas con la dilución I

$$\text{En el cuadrante control} = 54 \times 100 = 5400$$

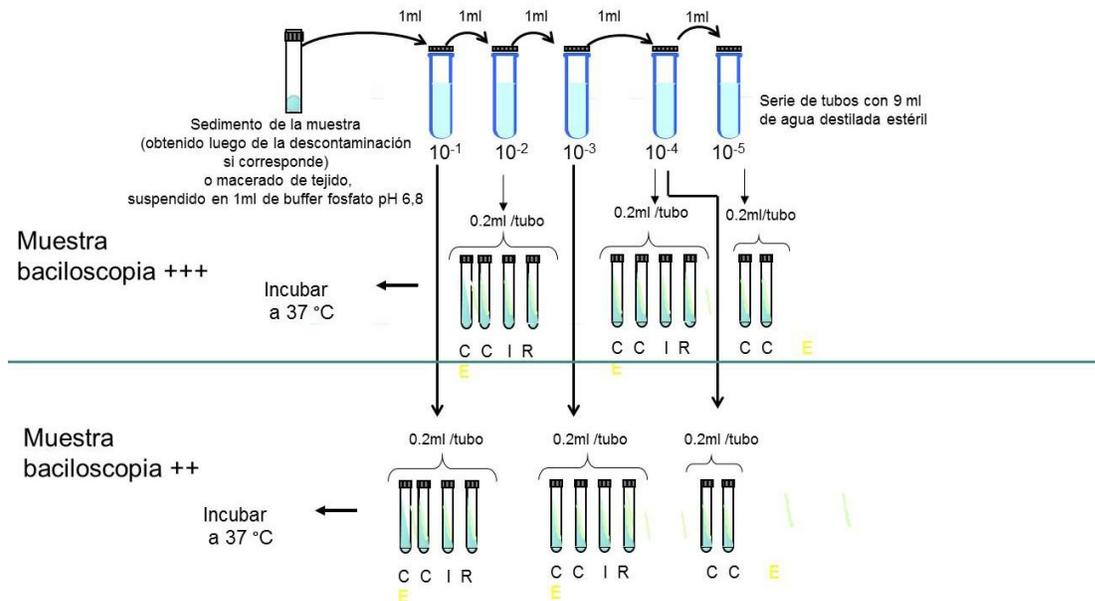
$$\text{Porcentaje de colonias desarrolladas con R} = 2 \times 100 / 5400 = 0,04\%$$

El desarrollo es inferior al 1% del inóculo, se clasifica al aislamiento como sensible a R.

Dado que el aislamiento resultó resistente a I, se dispone hacer PS a drogas de segunda línea, por si se considera necesario emplear alguna de ellas (ej una FQN) para tratar el caso.

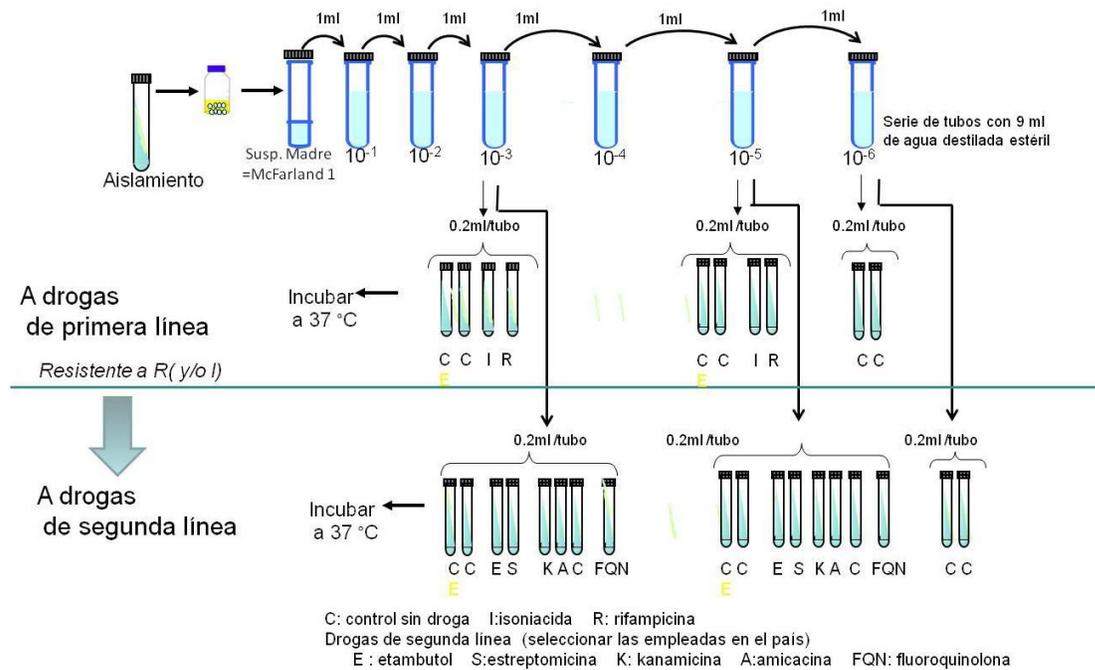
**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Prueba de sensibilidad directa a drogas de primera línea en medio Löwenstein-Jensen

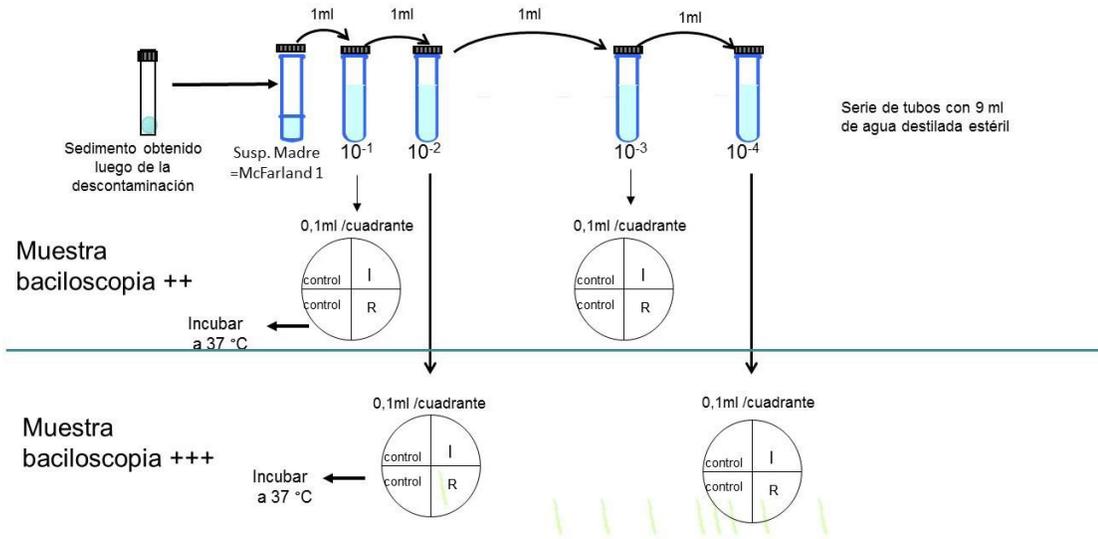


En el caso en que se conozca que el paciente es resistente a R y/o I sembrar con las mismas diluciones (según corresponda por el grado de positividad de la BK) tubos con drogas de segunda línea

Prueba de sensibilidad indirecta en medio Löwenstein-Jensen

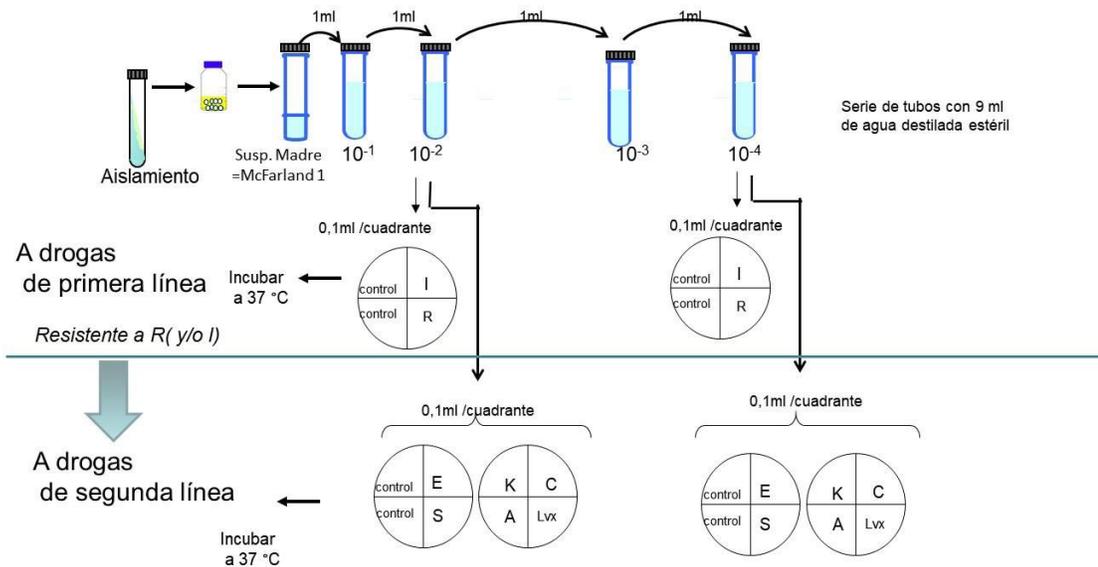


Prueba de sensibilidad directa a drogas de primera línea en medio Middlebrook 7H₁₀ ó 7H₁₁



En el caso en que se conozca que el paciente tiene TB resistente a R y/o I sembrar placas con drogas de segunda línea con las mismas diluciones (según corresponda por el grado de positividad de la BK)

Prueba de sensibilidad indirecta en medio Middlebrook 7H₁₀ ó 7H₁₁

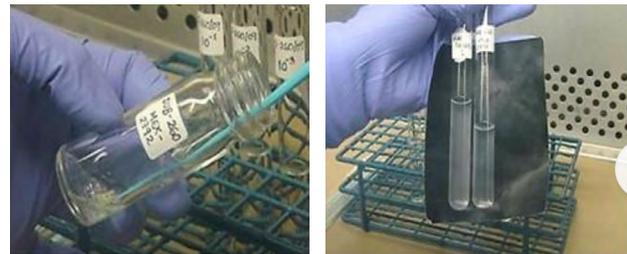


C: control sin droga I:isoniacida R: rifampicina
 Drogas de segunda línea (seleccionar las empleadas en el país)
 E: etambutol S:estreptomina K: kanamicina A:amicacina Lv: Levofloxacina
 Si se conocer que el paciente tiene TB resistente a Lv, incluir moxifloxacina

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Método de las proporciones en medios sólidos

Preparación del área de trabajo



*Preparación de la suspensión
bacilar madre*



Siembra



*Acondicionamiento para la
absorción de la siembra*



*Cuantificación y registro del
desarrollo*

Método de las proporciones en Löwentein Jensen



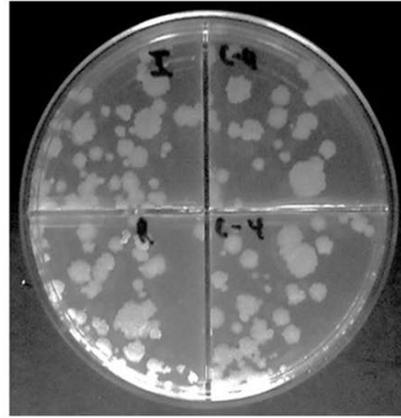
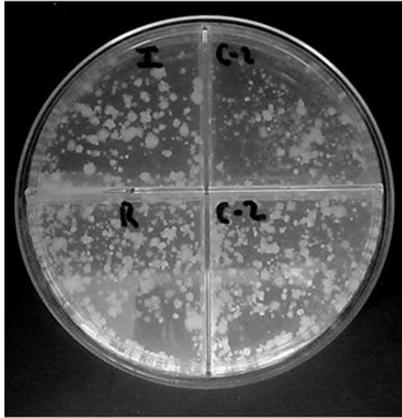
Aislamiento sensible a isoniacida y rifampicina



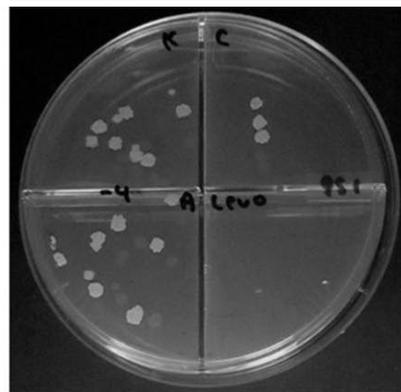
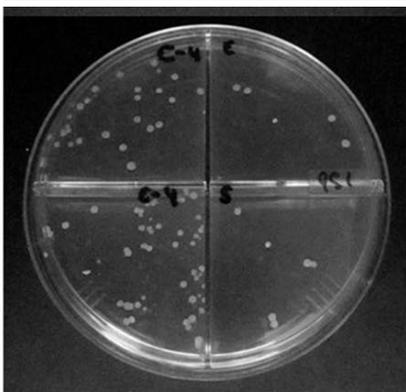
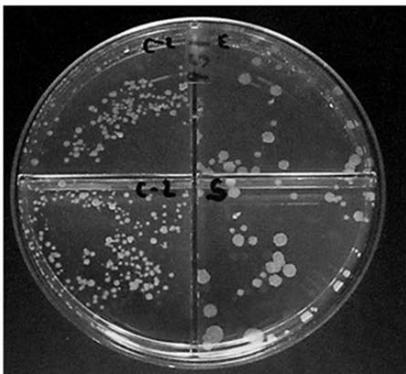
Aislamiento resistente a isoniacida ,rifampicina, estreptomocina, fluoroquinolona y kanamicina sensible a estambutol y capreomicina.



Método de las proporciones
en Middlebrook 7H₁₀



Aislamiento resistente a isoniacida y rifampicina



Aislamiento
resistente a etambutol, estreptomicina, kanamicina, capreomicina y
amicacina
sensible a levofloxacina

Prueba de pirazinamidasa

Principio

Los aislamientos de *M. tuberculosis* que son sensibles a la Z poseen la enzima pirazinamidasa que actúa en la transformación de la pirazinamida en ácido pirazinoico, y es esta última molécula la que es activa contra el bacilo. En cambio, los aislamientos que tienen alto nivel de resistencia a la Z, han perdido la actividad de esa enzima, como consecuencia de las mutaciones que aparecen en el gen que la codifica.

El método Wayne pone de manifiesto la formación de ácido pirazinoico cuando el bacilo se ha multiplicado en un medio de cultivo que contiene Z. Para ello, se agrega sulfato de hierro y amonio que forma con el ácido pirazinoico una sal ferrosa de color rosa. Para que esto sea posible debe haber abundante cantidad de bacilos en fase activa de multiplicación.

Limitaciones

Existen cepas con bajo nivel de resistencia a la concentración crítica de Z que tienen actividad enzimática.

Material biológico a investigar

Aislamientos jóvenes (hasta 3-4 semanas de desarrollo) obtenidos en medio sólido o líquido (método indirecto).

Cepas control

Positivo: cepa de referencia de *M. tuberculosis* sensible a las drogas, preferentemente *M. tuberculosis* H37Ra

Negativo: cepa de *M. bovis* BCG

Medios y reactivos

Por cada aislamiento y cepa control a investigar:

- 1 tubo con tapa a rosca con Medio Dubos con Z, con calidad controlada, rotulados con el número de aislamiento ó cepa correspondiente,
- solución de sulfato de hierro y amonio 1%.

Procedimiento

- Transferir abundante masa bacilar de cada cultivo (con asa desechable o pipeta según se trate de medio sólido o líquido respectivamente), a la superficie de un tubo de medio Dubos con Z. La reacción puede tener resultado falso negativo si el inóculo es escaso,
- Incubar a 37°C durante 7 días, en una gradilla en posición vertical,
- Finalizada la incubación, agregar a cada tubo 1 ml de la solución de sulfato ferroso amoniacal al 1%,
- Dejar 4 horas, en refrigeración a 2-8 °C,
- Poner cada tubo sobre un fondo blanco y examinar para detectar la presencia de una banda rosada.



Lectura e interpretación de resultados

Positivo

Aparición de banda rosada, cualquiera sea su intensidad. Se infiere que el aislamiento es sensible a la Z.

Negativo

No se observa la banda rosada. Se infiere que el aislamiento es resistente a la Z.

Cuando un cultivo es resistente sólo a Z, se debe considerar la diferenciación de *M. bovis* o *M. bovis* BCG dentro del complejo *M. tuberculosis*.

En el caso de ser *M. tuberculosis*, considerar que es poco frecuente que aparezca resistencia a Z no asociada a RR.

Método de nitrato reductasa (de Griess)

Principio

M. tuberculosis, como muchos otros microorganismos, tiene la enzima nitrato reductasa que interviene en la reducción del nitrato a nitrito (posible fuente de nitrógeno). Para evidenciarla, se cultiva al bacilo en medio con nitrato de sodio o potasio y luego se agregan tres soluciones que desencadenan una reacción a partir del nitrito y producen, finalmente, un derivado azoico coloreado (reacción de Griess). La presencia de nitrito indica que la enzima estuvo activa y por lo tanto que los bacilos están viables.

Aprovechando esta característica, es posible cultivar al bacilo en presencia de nitrato, con y sin droga antituberculosis, y evidenciar luego de una corta incubación si se mantuvo viable o no después de la acción de los fármacos.

El inóculo es sembrado 10 veces más diluido en el medio sin droga, según se ha determinado con la experimentación desarrollada para reproducir los resultados del método de las proporciones convencional. Se compara luego la intensidad del color de la reacción, y por ende, del desarrollo del medio que contiene droga con el que no la tiene. Si en el primero el color es más intenso que en el segundo, se infiere que ha crecido alto porcentaje de clones resistentes y por lo tanto que el bacilo es resistente.

Para determinar el momento en el que la prueba puede ser revelada, se siembra el inóculo en varios tubos control, conteniendo medio sin droga. Periódicamente se agregan las soluciones reveladoras a cada uno de ellos, hasta detectar aparición de color. En ese momento se considera que el desarrollo es suficiente para interpretar los resultados, y se procede a revelar el resto de los tubos sembrados con los antibióticos. La mayor parte de los resultados son obtenidos a las dos semanas de incubación.

Se infiere así si el bacilo es sensible o resistente a cada droga que se ensaye, más rápidamente que con las pruebas convencionales.

Limitaciones

La prueba ha sido validada sólo con R e I, Cuando se pretende identificar resistencias *borderline* es necesario recurrir a métodos convencionales en medios sólidos que aportan información acerca de la proporción de población bacilar que es resistente a cada droga.

Material biológico a investigar

- Suspensión bacteriana madre preparada con Muestras con BK positiva 2(+) o 3(+) (método directo)

Aislamientos jóvenes (hasta 3-4 semanas de desarrollo) medio sólido o líquido (método indirecto).

Cepas control (repiques jóvenes):

cepa de referencia de *M. tuberculosis* sensible a las drogas,

cepa de referencia resistente a R y sensible a I, cepa de referencia resistente a I y sensible a R.

- Dilución 1:10 de cada suspensión bacilar madre

Ver más arriba, bajo el título Preparación de suspensiones bacilares madres, la forma de prepararlas y diluirlas.

Medios y reactivos

Por cada muestra, aislamiento o cepa control a investigar

- Los siguientes tubos con tapa a rosca conteniendo medio de cultivo, que deben estar rotulados con el número de la muestra, aislamiento o cepa control a investigar:

3 tubos con Medio LJ conteniendo nitrato, sin droga antituberculosa (control),

1 tubo con Medio LJ conteniendo nitrato e I,
1 tubo con Medio LJ conteniendo nitrato y R.

- Ordenar los tubos ubicando en una gradilla, en serie, cada dilución a sembrar y los tubos

con medio correspondientes a esa dilución. Dejar un lugar libre al inicio para ir desplazando sistemáticamente cada tubo luego de sembrado, de manera que se eviten omisiones o doble siembra en un mismo tubo.

- Reactivos de revelado de la reacción de Griess 1 (ácido clorhídrico 50%); 2 (sulfanilamida 0,2%) y 3 (n-1-naftiletilendiamina dihidrocloruro 0,1%).

Materiales adicionales

- Una bandeja o charola con una varilla de vidrio u otro sostén, o gradilla que permita incubar los tubos inclinados (con la boca del tubo elevado aproximadamente 15 °).

Procedimiento

Inoculación

- De cada muestra, aislamiento o cepa control a investigar, inocular, 0.2 ml de la suspensión bacilar madre en el tubo con I y en el I tubo con R, 0.2 ml de la dilución 1:10, preparada a partir de la suspensión bacilar madre, en cada uno de los 3 tubos control.
- Tomar el primer tubo, distribuir suavemente la suspensión inoculada sobre toda la superficie del medio, verificar el cierre de la tapa sin apretarla, inclinar de inmediato en una bandeja o en una gradilla elevando la parte superior del tubo aproximadamente 15° C. Asegurar que el tubo no rote,
- Completar la operación anterior con todos los tubos sembrados,
- Incubar a 37° C.

Revelado

Los días después de iniciada la incubación en los que se revela la prueba varía según se haya

realizado el método directo (a partir de la muestra del paciente) o indirecto (a partir del aislamiento) como se indica a continuación.

	Días de incubación		
	1er revelado	2do revelado	3er revelado
Prueba directa	14	21	28
Prueba indirecta	7	10	14

Preparar inmediatamente antes de revelar una solución con un volumen de reactivo 1, dos volúmenes de reactivo 2 y dos volúmenes de reactivo 3. Calcular el volumen final a preparar de esta solución según el número de tubos que sea necesario revelar.

Primer revelado

Para cada prueba realizada

- Agregar 0.5 ml de la mezcla reveladora a uno de los tres tubos control,
- Si en ese tubo control se visualiza color rosa, rojo o fucsia, revelar los tubos con I y R correspondientes, leer e interpretar la reacción y descartar todo el material,
- Si no se visualiza aparición de color rosa, rojo o fucsia, descartar el tubo control al que se le agregó la solución reveladora e incubar el resto de los tubos no revelados.

Segundo revelado

Para cada prueba cuyo control no resultó positivo el día del primer revelado y se mantuvo en incubación

- Agregar 0.5 ml de la mezcla reveladora al segundo de los tres tubos control,
- Si en ese tubo control se visualiza color rosa, rojo o fucsia, revelar los tubos con I y R correspondientes, leer e interpretar la reacción y descartar todo el material,
- Si no se visualiza aparición de color rosa, rojo o fucsia, descartar el tubo control al que se le agregó la solución reveladora e incubar el resto de los tubos no revelados,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Tercer revelado

Para cada prueba cuyo control que no resultó positiva ni en el primer ni en el segundo revelado y se mantuvo en incubación

- Agregar 0.5 ml de la mezcla reveladora al tercero y último de los tres tubos control,
- Si en ese tubo control se visualiza color rosa, rojo o fucsia, revelar los tubos con I y R correspondientes, leer e interpretar la reacción y descartar todo el material,
- Si no se visualiza aparición de color rosa, rojo o fucsia, la prueba es no interpretable.

Lectura e interpretación de resultados

- Comparar el color del tubo con I y del tubo con R tubo con el color desarrollado en el tubo control.

Volver en ensayar todo aislamiento con resultado dudoso o no interpretable, preferentemente por un método convencional.



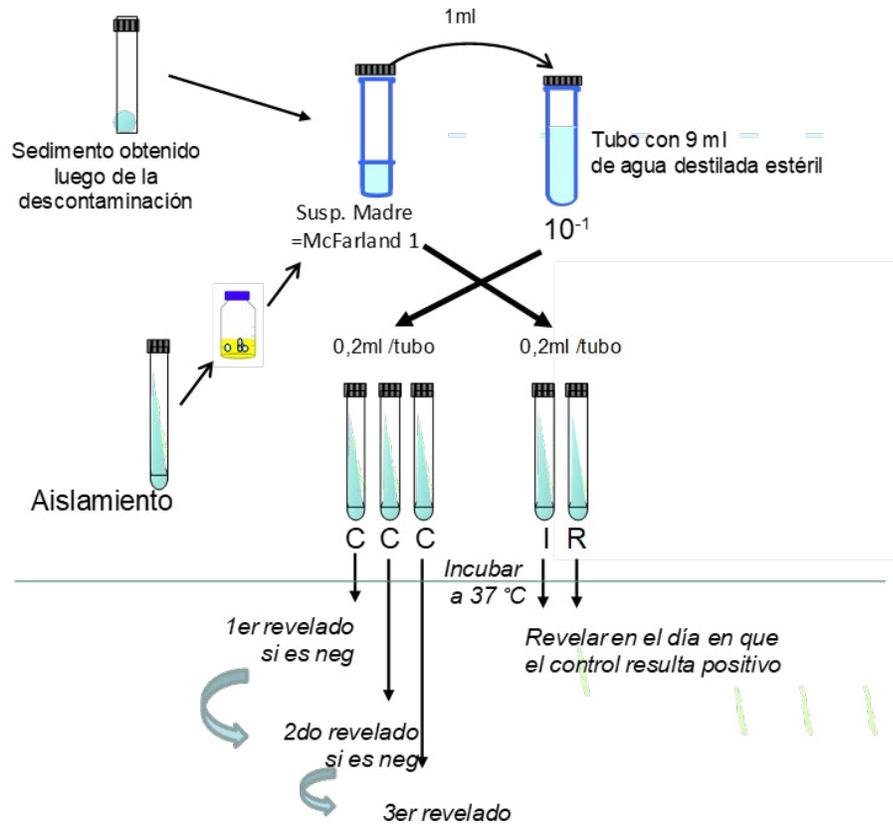
Positivo

Intensidad de color mayor o igual a la del tubo control.
Se infiere que el aislamiento es resistente a la droga que se está examinando.

Negativo

Sin color o intensidad de color menor a la del tubo control.
Se infiere que el aislamiento es sensible a la droga que se está examinando.

Prueba de sensibilidad directa e indirecta por el método de nitrato reductasa (Griess)



	Días de incubación		
	1er revelado	2do revelado	3er revelado
Prueba directa	14	21	28
Prueba indirecta	7	10	14

PRUEBA DE SENSIBILIDAD EN MEDIO LÍQUIDO

Método comercial MGIT

Principio

El tubo con indicador de crecimiento MGIT contiene caldo Middlebrook 7H9 y una silicona, ubicada en su base. La silicona contiene un compuesto con un fluorocromo unido a oxígeno, y así unido está inactivado. Cuando algún microorganismo, al respirar y multiplicarse, consume el oxígeno, el fluorocromo se activa, y la fluorescencia puede ser evidenciada con luz UV. Esta fluorescencia es una indicación del desarrollo del microorganismo que puede ser detectado muy rápidamente. El inóculo del bacilo de la TB estandarizado para la PS es detectado en la mayor parte de los casos en un período de 3-14 días después de la inoculación.

El medio es provisto por la industria en tubos conteniendo 7 ml para lectura automatizada, y 4 ml para lectura visual. Para investigar la actividad de la Z se emplean tubos de 7 ml acidificados a pH 5,9.

La PS estandarizada es indirecta. Para realizarla, se agrega la concentración crítica de cada droga a ensayar en un tubo de MGIT. A la serie de tubos con drogas, se agrega un tubo MGIT sin droga (control). Para investigar la actividad de Z se debe preparar otra serie de dos tubos MGIT pH 5,9, uno control y otro con la droga.

Si el bacilo es sensible, la droga se inhibirá el crecimiento y la fluorescencia en el tubo correspondiente. Por el contrario, si el bacilo es resistente desarrollará en el tubo con droga y por lo tanto también habrá fluorescencia. En ambos casos, el desarrollo del bacilo y la fluorescencia deberán manifestarse en el tubo control.

Para reproducir el principio del método de las proporciones, el control es sembrado con un inóculo diluido 100 veces, en relación con el que se siembra en los tubos con drogas (excepto para la Z). Si la fluorescencia en el tubo con una droga se acerca o supera a la del tubo control, se infiere que ha crecido más del 1% de clones resistentes y, entonces, el equipo clasifica al aislamiento del bacilo como resistente al fármaco en cuestión.

La fluorescencia puede ser visualizada al hacer incidir luz UV en cada tubo sembrado manualmente, o puede ser monitoreada con un equipo denominado MGIT960 ó 320. Estos números indican la capacidad, en cantidad de tubos, que puede incubar cada uno de ellos. Cada 60 minutos, el equipo estimula con UV cada tubo, hace lecturas y las registra como unidades de crecimiento (GU por las siglas del nombre en inglés *growth units*).

Para que se pueda interpretar los resultados, los tubos de una PS deben estar agrupados y correctamente ordenados en un mismo portatubos (AST *carrier* según lo denomina el fabricante en inglés).

Existe un software básico estándar (BD EpiCenter™) que interrumpe e interpreta los resultados de la PS cuando la fluorescencia del tubo control supera 400 GU, o invalida la PS cuando eso no sucede entre los 4 y 14 días de incubación (entre los 4 y 21 días en el caso de Z). Cuando el control supera 400 GU, dentro del plazo mencionado, el equipo analiza el crecimiento registrado en cada tubo con droga. El aislamiento es clasificado como sensible a una droga si la lectura en el tubo que la contiene es menor a 100 GU, de lo contrario es clasificado como resistente. El software muestra las curvas de crecimiento construidas con lecturas registradas por el equipo durante todo el tiempo en que se incuba la PS. La observación de las curvas permite detectar y verificar resultados que no son normales o comunes. El software EpiCenter permite el ingreso de PS a SIRE y a Z, para otras series de drogas es necesario ingresarlas como "no definidas" o utilizar un artilugio.

Existe otro software especial (BD EpiCenter™ TB-eXiST) que es más complicado para utilizar pero que permite que el operador diseñe las PS con las drogas que desee, según sea necesario, prolongue la incubación y haga su propia interpretación de los resultados.

El sistema automatizado se provee con POEs elaborados por el fabricante muy detallados para realizar la PS y operar el equipo. Se describen

aquí los procedimientos vigentes en el momento de redacción de esta Guía, pero podrían variar si el fabricante introduce modificaciones en el sistema.

Limitaciones

La PS con lectura visual ha sido estandarizada para ensayar sólo I y R.

Cuando se emplea lectura automatizada (MGIT960 ó 320), la interrupción automática de la prueba es desventajosa para aislamientos disgénicos o que tienen bajo porcentaje de clones resistentes y que pueden requerir incubación más prolongada. Esto se ha demostrado para aislamientos con resistencia *borderline* a R. Ese tipo de resistencia es detectado por pruebas moleculares y ha sido asociada a falla de tratamiento con drogas de primera línea.

También se han identificado discordancias con cepas *borderline* frente a E, y el sistema parece producir falso resultados resistentes para Z.

Cuando se sospecha que se está frente a este tipo de aislamientos, y ante una discordancia con resultados de métodos moleculares, conviene recurrir a repetir la prueba por el método molecular y/o en medio sólido (que permite prolongar la incubación y cuantificar la proporción de la población de bacilos que es resistente), e identificar mutaciones mediante secuenciación si esta herramienta estuviera disponible.

Precauciones

Cualquier germen coexistente con *M. tuberculosis* que haya pasado desapercibido o que pudiera agregarse durante el procesamiento genera resultados erróneos y probablemente graves para el paciente. Se debe asegurar que el aislamiento de *M. tuberculosis* que se está investigando sea el único germen inoculado en la PS, verificando la pureza del cultivo. Además se debe operar en condiciones estrictas de asepsia, con buenas prácticas para evitar la contaminación con gérmenes ambientales y también la contaminación cruzada entre distintas cepas que se manipulen en una jornada de trabajo. El medio líquido facilita el desarrollo de contaminantes.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Por lo general cuando desarrolla un germen común, la PS es invalidada por el equipo de lectura automática al detectar desarrollo antes de los 4 días de incubación. Una señal precoz puede también ser generada por alguna micobacteria ambiental, sobre todo si es de rápido crecimiento. La detección de una micobacteria ambiental presenta un desafío que requiere de la intervención de personal experimentado, más aún si coexiste con *M. tuberculosis*. Es una situación poco frecuente, pero que puede suceder, en especial con material de pacientes muy inmunosuprimidos.

Se requiere extremar la bioseguridad porque es más probable que se generen aerosoles con medio líquido que con medio sólido.

Las monorresistencias a E, R y Z son muy poco frecuentes. Un resultado de este tipo debe ser confirmado.

Preparación del inóculo

Material biológico a investigar

Aislamientos o cultivos jóvenes y puros, identificados como *M. tuberculosis*, obtenidos en medios líquidos o sólidos.

Para verificar la pureza:

- Examinar microscópicamente un extendido preparado con el aislamiento y teñido mediante la técnica de Ziehl-Neelsen (ver parte 1 de esta Guía, Baciloscopia). Verificar que sólo se observen BAAR,
- Si, a pesar del examen microscópico, persiste la sospecha de contaminación no manifiesta, estriar con asa una muestra del cultivo en placas con agar sangre (o agar chocolate o cerebro-corazón), incubar a 37°C por 48 horas y verificar la ausencia de gérmenes comunes. Si se detecta contaminación, procesar otro aislamiento del mismo paciente si fuera posible, y si no se dispone de otro aislamiento, proceder a descontaminar (ver parte 2 de este Manual, cultivo).

Materiales adicionales

Por cada aislamiento a investigar

- 1 tubo de vidrio con tapa a rosca estéril, conteniendo 4,5 ml de agua destilada estéril
- 1 tubo de vidrio con tapa a rosca estéril, conteniendo 9,9 ml de agua destilada estéril

Rotular con el número de cada material a investigar

Procedimiento

Aislamiento de *M. tuberculosis* obtenido en medio líquido en equipo con lectura automatizada

- Incubar el cultivo entre 1 y 5 días después de detectada la señal positiva,

Si el cultivo tiene más de 5 días después de detectada la señal positiva, repicar en otro tubo MGIT e incubar hasta que resulte nuevamente positivo.

Nota: esta es la recomendación del fabricante. Algunos laboratorios de referencia de Latinoamérica han experimentado que se obtienen resultados válidos, más rápidos y con menor costo si se iguala la turbidez del tubo que tiene más de 5 días de positivo con la de un patrón Mc Farland 1, y se continúa inmediatamente el procedimiento.

- Agitar el cultivo con vortex,
- Dejar reposar 15 a 30 minutos para decantar los grumos y evitar la dispersión de aerosoles,

Las suspensiones preparadas con otro tipo de aislamientos deben ser estandarizadas usando un patrón de turbidez

Materiales adicionales

- Patrón de turbidez Mc Farland 0,5

Nota: el fabricante recomienda el patrón de turbidez Mc Farland 0,5. Algunos laboratorios de referencia de Latinoamérica han experimentado que el empleo del

patrón de turbidez Mc Farland 1 es más adecuado para reducir la frecuencia de resultados inválidos, por escaso desarrollo en el tubo control.

Aislamiento de *M. tuberculosis* obtenido en medio líquido y detectado visualmente.

- Dejar sedimentar el tubo o botella conteniendo el aislamiento durante 15 a 30 minutos,
- Retirar con una pipeta. aproximadamente 5 ml de la suspensión (sin tocar el sedimento) y transferirla al tubo o frasco con perlas de vidrio. Descartar la pipeta,
- Asegurar el cierre de la tapa del tubo o frasco y agitar en vortex hasta verificar que la suspensión esté homogénea, sin grumos,
- Dejar reposar 15 a 30 minutos, para decantar grumos que pudieran persistir, y disminuir el riesgo de dispersar aerosoles,
- Verificar que no queden grumos en el sobrenadante; si se detectan y no pueden ser disgregados repitiendo los dos pasos anteriores, preparar nuevamente la suspensión desde un inicio,
- Con una pipeta, suavemente, retirar el sobrenadante (sin tocar los grumos que pudieran haber sedimentado en el fondo del tubo o frasco) y transferirlo a un tubo con tapa a rosca. Descartar la pipeta,
- Agregar agua destilada estéril, poco a poco, hasta que la opacidad se iguale a simple vista a la del patrón de turbidez,
- Dejar reposar al menos 15 minutos antes de proseguir con las diluciones.

Aislamiento de *M. tuberculosis* obtenido en medio sólido (LJ, Ogawa o agar)

Materiales adicionales

- Patrón de turbidez Mc Farland 0,5

Nota: el fabricante recomienda el patrón de turbidez Mc Farland 0,5. Algunos laboratorios de referencia de Latinoamérica han experimentado que el empleo del patrón de turbidez Mc Farland 1 es más adecuado para reducir la frecuencia de resultados inválidos por escaso desarrollo en el tubo control.

Por cultivo a procesar

- 1 botella o tubo de vidrio muy resistente, o de plástico muy transparente, con capacidad para 15-20 ml, con tapa a rosca, conteniendo 5-10 perlas de vidrio, estéril, rotulado con el número de cada aislamiento a investigar

Procedimiento

- Tomar con un asa masa bacilar, procurando tomar material de todas las colonias o de toda la napa, evitando arrastrar medio de cultivo. Si el aislamiento tiene desarrollo escaso, tomar masa bacilar de todos los tubos disponibles,
- Colocar el material en el tubo o frasco con perlas de vidrio. Descartar el asa,
- Asegurar el cierre de la tapa del tubo o frasco y agitar en vortex hasta disgregar totalmente, comprobando que no queden grumos,
- Agregar 1 ml de agua destilada estéril,
- Asegurar el cierre de la tapa del tubo o frasco, y agitar en vortex hasta homogeneizar,
- Dejar reposar 15 a 30 minutos, para sedimentar grumos y disminuir el riesgo de dispersar aerosoles,
- Verificar que no queden grumos en el sobrenadante; si se detectan y no pueden ser disgregados repitiendo los dos pasos anteriores, preparar nuevamente la suspensión desde un inicio,

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

- Con una pipeta, suavemente, retirar el sobrenadante (sin tocar los grumos que pudieran haber decantado) y transferirlo a un tubo con tapa a rosca. Descartar la pipeta,
- Agregar agua destilada estéril, poco a poco, hasta que la opacidad se iguale, a simple vista, a la del patrón de turbidez,
- Dejar sedimentar al menos 15 minutos antes de proseguir con las diluciones.

Dilución de las suspensiones bacilares

A continuación se denomina suspensión A a la que se debe sembrar en los tubos con droga. Dependiendo del material del que se parta, para preparar la suspensión A se deberá proceder o no a hacer alguna dilución, según lo detalla la siguiente tabla:

Aislamiento obtenido en		Suspensión A (a inocular en los tubos con drogas)	
MGIT 960 ó 320	Días transcurridos desde que se registró la señal positiva del aislamiento	1 ó 2	Cultivo sin diluir
		3 a 5	cultivo diluido 1:5
Suspensión de otros aislamientos con turbidez igualada al patrón Mc Farland		suspensión madre diluida 1:5	

Procedimiento

Materiales adicionales

Por PS a realizar

- 1 tubo con tapa a rosca conteniendo 4 ml de solución salina o agua destilada estéril con el rótulo 1:5 y el número de aislamiento a procesar,
- (no es necesario para cultivos obtenidos en equipo de lectura automatizada MGIT procesados 1 ó 2 días después de detectada la señal positiva)
- 1 tubo con 9,9 ml de solución salina o agua destilada estéril con el rótulo 1:100 y el número de aislamiento a procesar,
- en el caso en que se realice PS a Z, agregar 1 tubo con 4,5 ml de solución salina o agua destilada estéril con el rótulo 1:10 y el número de aislamiento a procesar,
- 1 micropipeta unicanal calibrada con dispensado de volumen variable entre 100 µl y 1000 µl,

- puntas (tips) adecuadas para la micropipeta.

Al realizar los siguientes pasos, no abrir un tubo sin haber cerrado previamente el anterior

Dilución 1:5 para preparar la solución A no debe ser realizada si se procesa un cultivo obtenido en equipo MGIT luego de transcurridos sólo 1 ó 2 días desde la señal positiva

- Tomar suavemente, con micropipeta , 1 ml del sobrenadante del cultivo en medio líquido, o de la suspensión con opacidad igualada al patrón de turbidez, según corresponda, evitando mover el sedimento, y transferirlo al tubo con 4 ml de agua destilada estéril. Descartar la punta,
- Agitar con vortex,
- Dejar reposar 15 a 30 minutos para decantar eventuales los grumos y evitar la dispersión de aerosoles

Dilución 1:100 para inocular el tubo control

- Tomar con micropipeta 0,1 ml de la suspensión A y transferir a un tubo con 9,9 ml de agua destilada estéril,
- Agitar con vortex.

Dilución 1:10 (para inocular el tubo control de la PS a Z, en el caso en que sea realizada)

- Tomar con micropipeta 0,5 ml de la suspensión A y transferir a un tubo con 4,5 ml de agua destilada estéril,
- Agitar con vortex.

Inoculación e incubación

Materiales adicionales

Para el método en sistema MGIT960 ó 320, por cada aislamiento a investigar

- 1 portatubos (AST *carrier* provisto por el fabricante) con la capacidad adecuada para contener el tubo control y los tubos con las drogas a ensayar en la PS (excepto la Z),•
- 1 portatubos (AST *carrier* provisto por el fabricante) para contener el tubo control con pH acidificado y el tubo con Z (en el caso en que se incluya esta droga en el PS).

Observaciones

Cuando el *carrier* disponible no tiene capacidad suficiente para ensayar todas las drogas que integran la PS, se deberá preparar un segundo *carrier* con su propio control, como si fuera otra PS. Por ejemplo, si se necesita ensayar 5 drogas y sólo se disponen de *carriers* con capacidad para 5 tubos, se ubicará un tubo control y 4 drogas en un *carrier*, y otro tubo control y la droga restante en otro *carrier*. De manera, que esta situación, se deben preparar dos tubos control.

Cuando el *carrier* disponible excede la capacidad necesaria, se podrán utilizar tubos blancos de MGIT (no inoculado, sin droga) para completar los espacios vacíos.

Medios y reactivos

Por cada aislamiento o cepa control a investigar,

- 1 tubo MGIT sin droga con enriquecimiento OADC, rotulado como "control" y el número del aislamiento a investigar ,
- Multiplicar este número por el número de *carriers* que sea necesario utilizar, en el caso en que sea necesario más de uno.
- 1 tubo MGIT con enriquecimiento OADC y cada una de las drogas a ensayar (excepto Z) , rotulados con el nombre de la droga que contiene y el número de aislamiento a investigar,

Para el equipo MGIT 960 ó 320 se emplean tubos MGIT con 7 ml de medio, para la realizar la PS a I y R con lectura visual los tubos con 4 ml de medio.

En el caso en que se realice PS a Z, agregar por cada prueba

- 1 tubo MGIT con Suplemento BACTEC MGIT 960 PZA sin droga, rotulado como "control" y el número del aislamiento a investigar,
- 1 tubo MGIT con Suplemento BACTEC MGIT 960 PZA y con Z agregada, rotulado con el nombre de la droga (Z) y aislamiento correspondiente.

Los tubos MGIT, suplemento y drogas deben pertenecer a lotes con calidad controlada.

El rótulo puede ser escrito o adherido con una etiqueta sobre la pared lateral de cada tubo de la serie, cuidando no obstruir su código de barras.

- Ordenar en serie en una gradilla cada PS.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Colocar la suspensión A y continuación los tubos con drogas que se van a ser ensayadas.
- Colocar la dilución 1:100 de la suspensión A y a continuación el tubo control de la PS (o tantos como *carriers* a utilizar en el PS en el caso en que fuera necesario más de uno).
- Colocar la dilución 1:10 de la suspensión A y a continuación el tubo control pH 5,9 de la PS a Z (en el caso en se ensaye esa droga).
- Dejar un lugar al inicio de cada serie para desplazar sistemáticamente cada tubo luego de completada la siembra, de manera que se eviten omisiones o repeticiones.

Procedimiento

Por cada aislamiento a investigar,

- Agregar 0,5 ml de la suspensión A a cada uno de los tubos que contiene droga, incluyendo a la Z en el caso en que sea ensayada. No inocular con esta suspensión el tubo control,
- Inocular 0,5 ml de la dilución 1:100 en el tubo control de la PS (o en todos los tubos control si se emplea más de un *carrier*), excepto en el tubo control de Z,
- en el caso de realizar PS a Z, inocular 0,5 ml de la dilución 1:10 en el tubo control MGIT pH 5,9,
- Ajustar bien las tapas de los tubos, y mezclar el contenido de cada tubo, invirtiéndolo 3 ó 4 veces,
- En el caso de estar realizando la prueba con lectura manual, incubar los tubos en gradilla en una estufa a 37°C,
- En el caso de emplear equipo MGIT960 ó 320, colocar los tubos de una PS (sin Z) en el portatubos (*carrier*) apropiado, o en más de un *carrier* si fuera necesario, según lo indicado arriba.

Si se hubiera sembrado la PS a Z, colocar los dos tubos acidificados inoculados (control y con Z) en otro *carrier* aparte.

Seguir las instrucciones del fabricante para introducir los tubos en el equipo, que, en resumen, comprenden los siguientes pasos:

- Ubicar en los portatubos primero, a la izquierda el control y luego las drogas ordenadas siempre de la misma forma, sistemáticamente.

Por ejemplo:

Control IR (en un portatubos con capacidad para 3 tubos)

Control SIRE y control KACLfx (ó Mxf) (en dos portatubos con capacidad para 5 tubos cada uno)

Control Z (en un portatubos con capacidad para 2 tubos)

- Abrir uno de los cajones del instrumento MGIT960, apretar el botón, 
- Aproximar el código de barras del portatubos al lector de código de barras que estará iluminado,
- Ubicar el portatubos en las estaciones iluminadas dentro del cajón,
- Ingresar en el software los datos de la PS correspondiente,

Con el software BD EpiCenter, es posible ingresar la PS a IR, SIRE y Z pero no ofrece otras posibilidades. En el caso de que se ingrese un portatubos con otras drogas (por ejemplo KACLfx), ingresarlo como si fuera SIRE habiendo anotado apropiadamente en los registros del laboratorio que, en ese caso, la PS ha sido hecha con KACLfx.

- Apretar la tecla OK,
- Cerrar el cajón,
- Relacionar la prueba con la identificación del paciente empleando el software BD EpiCenter de la siguiente forma:

- Pulsar el segundo icono de la barra de herramientas y la solapa “Entrada rápida”.

Ingresar el número de identificación del aislamiento en los campos el ID y N° de acceso,

Ingresar el apellido y nombre del paciente en el campo correspondiente,

Completar el resto de la información.

- Seleccionar la solapa “Test” y la etiqueta “Huérfanos”, abajo y a la izquierda de la pantalla.
- Seleccionar el código del portatubos de la PS que se está ingresando,

Asignar el número de test (PS) que corresponda,

Utilizar el espacio desinado al test número 2 o subsiguientes, si ya se hubiera realizado PS anterior (es) para ese paciente,

Si se quiere registrar una PS con drogas diferentes a las que ofrece el equipo, se puede seleccionar el test número mayor de 10, y registrar en un listado aparte la secuencia de drogas que se ha sembrado en esa PS,

- Pulsar OK y guardar

Emplear en una planilla diseñada para tal fin si no se cuenta con el software).

Lectura y registro de resultados

Lectura manual

Equipo y materiales adicionales

- Lámpara-linterna portable que emita luz UV
- 1 tubo MGIT sin inocular (control negativo)

Procedimiento

Precaución:

no hacer incidir la luz UV en los ojos
No es necesario cuarto oscuro

- Inspeccionar cada dos días haciendo incidir la luz UV en cada tubo,
- Observar si aparece fluorescencia color naranja en el fondo de cada tubo. Comparar con lo que se visualiza al iluminar un control negativo (MGIT sin inocular) para facilitar la lectura,
- Cuando aparece fluorescencia en el tubo control positivo (sembrado con la dilución 1:100 de las suspensión A) , incubar la prueba por 2 días adicionales a 37°C,
- Finalizados los 2 días adicionales, comparar la fluorescencia de los tubos con drogas con la correspondiente al tubo control positivo,
- Para cada droga ensayada, interpretar y registrar el resultado según se indica a continuación.

Tubo con droga	Interpretación
sin fluorescencia	sensible
con fluorescencia de igual o mayor intensidad que el tubo control	resistente

Si el tubo control (sin droga) no emite fluorescencia finalizada la tercera semana de incubación, no es posible interpretar el resultado. Repetir la prueba.

En caso de duda en relación con la fluorescencia correspondiente a un tubo que contiene droga, re-incubar la PS hasta 2 días más. Si persiste la duda, repetir la prueba.

Lectura automatizada

(con instrumento MGIT 960 ó 320)

- Controlar diariamente el equipo que identifica las PS finalizadas , reporta los resultados automáticamente, y las curvas de crecimiento producidas,
- Una vez finalizada la PS , agitar manualmente los tubos control y verificar la presencia de los grumos característicos de M. tuberculosis.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Precauciones para interpretar los resultados

Hallazgo	Conducta a seguir
	Descartar la presencia de gérmenes comunes mediante un extendido de los tubos sospechados, tinción de Ziehl Neelsen y examen microscópico. En caso de dudas persistentes, estriar una muestra del caldo en medios de cultivo aptos para el crecimiento de gérmenes comunes
Crecimiento del control muy rápido y/o presencia de una suspensión bacteriana homogénea y/o polirresistencia a las drogas	Descartar la presencia de una micobacteria ambiental verificando la velocidad de desarrollo del primo aislamiento y morfología de las colonias en medios sólidos. Identificar mediante prueba molecular diseñada para identificar micobacterias ambientales (incluyendo LPA) cualquier colonia aislada con morfología no compatible con <i>M. tuberculosis</i> . Si no está disponible, realizar la prueba de PNB o PAS. Si se confirma la presencia de gérmenes no ácido-alcohol resistentes, o de alguna micobacteria ambiental en presencia o ausencia de <i>M. tuberculosis</i> , anular los resultados de la PS y repetir con un aislamiento puro de <i>M. tuberculosis</i> Si el crecimiento del control fue muy rápido y se verifica la pureza del cultivo de <i>M. tuberculosis</i> , repetir la PS porque pudo haber existido exceso de inóculo
Monorresistencia a E	Es infrecuente, repetir la prueba, si es posible con un método alternativo
Monorresistencia a Z	La resistencia a Z no asociada a RR es infrecuente, repetir la prueba, si es posible con un método alternativo
Curvas de crecimiento que en los tubos con droga se aproximan o mantienen cerca de las 100 GU y no superan las 400 GU	Pueden reflejar una resistencia borderline. Repetir la prueba con las drogas con las que se haya detectado este hallazgo, si es posible también con un método alternativo
Error	Consultar el Manual de equipo la posible causa del error, resolver el problema según lo indica el fabricante antes de repetir la PS

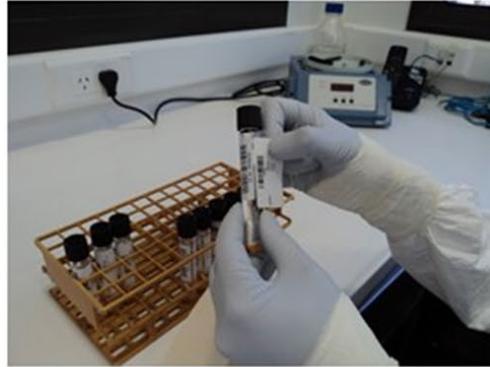
Ejemplo de resistencia *borderline* a I y R según la curva de crecimiento

Grafico del conjunto de transportador de tubos AST (hasta 8 tubo)

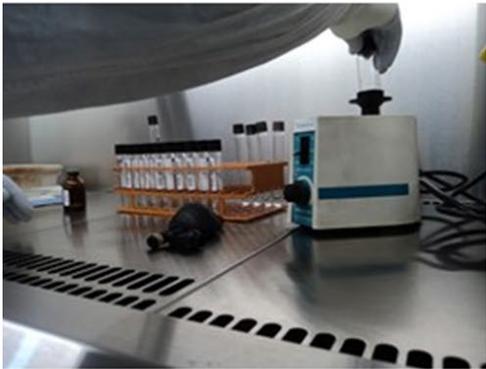


Fecha inicio 02/09/2011
N° de secuencia 439330013771

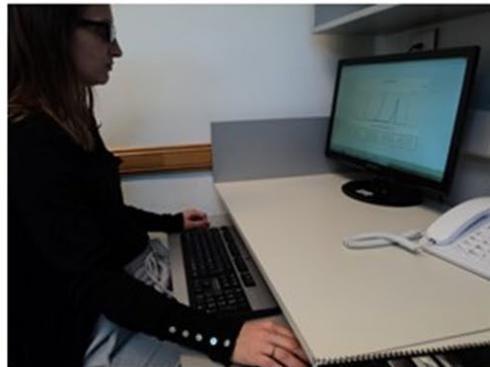
Prueba de sensibilidad en MGIT 320/960



Impresión de etiquetas y rotulado de tubos



Preparación y siembra del inóculo



Revisión de registros y curvas de desarrollo dentro y fuera del área de contención de riesgo biológico

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD MOLECULARES

Métodos comerciales

Xpert® MTB/Rif

El sistema está siendo perfeccionado técnicamente en el momento de redacción de esta Guía. Las siguientes descripciones, instrucciones y recomendaciones se basan en la evidencia conocida hasta ese momento.

Principio

Este sistema permite identificar la presencia del complejo *M. tuberculosis* en muestras de origen clínico y las mutaciones que más frecuentemente originan su RR, en pocas horas. Integra y automatiza el procesamiento de la muestra incluyendo la extracción de ADN (purificación y concentración del material genómico de las células capturadas y sonicadas), la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de secuencias blanco. Los reactivos (*primers*, sondas, enzimas, sales, buffers, tensioactivos) son provistos liofilizados dentro los compartimentos de un cartucho cerrado. El cartucho debe ser desechado luego de utilizado, sin ser abierto en ninguna instancia del proceso, lo que minimiza el riesgo de contaminación cruzada.

La muestra es inicialmente tratada con una solución descontaminante compuesta por hidróxido de sodio e isopropanol, lo que minimiza el riesgo biológico. A la vez, inutiliza la muestra para cultivo.

El primer tipo de cartucho desarrollado (Xpert® MTB/RIF) contiene *primers* que amplifican una región del gen *rpoB* que contiene 81 pb donde se producen las mutaciones más frecuentes que originan RR y una región específica del complejo *M. tuberculosis*. Cada sonda reproduce una fracción de la secuencia blanco investigada tal como está en el bacilo que no ha mutado, es decir que es sensible a R. Luego, se emplean 5 sondas marcadas con fluorocromo de distinto color. Cuando hibridan, las sondas emiten la señal fluorescente que es captada mediante un sensor y cuantificada mediante un *software*. El *software* representa en una curva la cuantificación de la señal en tiempo real. Para cada sonda está estandarizado el número de ciclos de amplificación por sobre el cual la reacción es clasificada como positiva (Ct por las siglas de su nombre en inglés *cycle threshold*). Si las 5 sondas hibridan dentro de ese tiempo (es decir sin retraso) se identifica la presencia del complejo *M. tuberculosis* sensible a R (*wildtype*). Si alguna(s) de la(s) sondas no hibrida o lo hace con retraso en relación con ese tiempo límite, se identifica una mutación en la región genética investigada y por lo tanto se infiere la presencia de *M. tuberculosis* RR. Si la reacción es totalmente negativa, se interpreta que no se ha detectado la presencia del complejo *M. tuberculosis*.

Para incrementar la sensibilidad del sistema, posteriormente, se desarrolló el cartucho Xpert® MTB/RIF Ultra con *primers* que, además del gen *rpoB*, amplifican dos secuencias que se encuentran en múltiples copias en el genoma del complejo *M. tuberculosis* (IS6110 and IS1081). Además, su cámara de PCR admite mayor volumen (50 µl en el Ultra vs 25 µl in Xpert MTB/RIF). Por otra parte, para diferenciar las mutaciones

y distinguir con mayor precisión mutaciones silentes de las que efectivamente confieren RR, el *software* modificado analiza la temperatura de fusión (o T_m , del inglés *melting temperature*) correspondiente a 4 sondas que se superponen cubriendo la secuencia blanco del gen *rpoB*. Un cambio en el patrón de T_m correspondiente a las cepas sensibles permite identificar a las mutantes.

La prueba se completa al cabo de cerca de 2 horas con el cartucho Xpert MTB/RIF y 1 hora y 15 minutos con el cartucho Xpert Ultra.

El Xpert detecta algunas mutaciones que generan resistencia borderline y que pueden causar falsos resultados sensibles en el sistema MGIT 960/320.

El sistema emplea

- un control del procesamiento de la muestra y de la presencia de inhibidores (SPC por las siglas de su nombre en inglés *sample processing control*); para esto verifica la amplificación de ADN de esporas no infecciosas de un germen ambiental, *Bacillus globigii*, contenidas en los cartuchos
- un control de sondas que mide, antes de que se inicie la PCR, la señal de fluorescencia para verificar la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de PCR, la integridad de las sondas y la estabilidad de los colorantes fluorescentes (PCC por las siglas de su nombre en inglés *probe check control*).

Para el procesamiento, cada cartucho es insertado dentro de un módulo del equipo. Existen equipos estándar con 1 a 16 módulos, y grandes equipos que permiten utilizar hasta 80 módulos. Es una plataforma múltiple que permite investigar, con distintos cartuchos, no solo TB sino también otras enfermedades infecciosas y factores de riesgo.

El sistema comprende un equipo con módulos para albergar los cartuchos, una computadora personal, un *software* que debe mantenerse actualizado con la última versión para investigar TB, un scanner

para captar el código de barras de cada cartucho, y POEs detallados para el procesamiento de muestras y operación del equipo.

Se describen aquí los procedimientos vigentes en el momento de redacción de esta Guía, pero podrían variar si el fabricante introduce modificaciones en el sistema.

Limitaciones

La evidencia acerca de la precisión que se alcanza con el Xpert Ultra es incipiente en el momento de redacción de esta Guía.

No existe evidencia suficiente para recomendar el empleo de este método con heces, sangre ni orina.

El líquido pleural no es la mejor muestra para diagnosticar la TB pleural, y por lo tanto la probabilidad de que resulte positiva por Xpert es menor en relación con otras muestras extrapulmonares, es preferible la biopsia pleural.

Las muestras sanguinolentas o xantocrómicas de líquidos cefalorraquídeos pueden generar resultados falso negativos.

Con ambos cartuchos, es posible alcanzar mayor sensibilidad que la BK para detectar TB, pero menor que la que tiene el cultivo con muestras con BK negativa. El cartucho Xpert® MTB/RIF Ultra es más sensible que Xpert MTB/RIF, especialmente con muestras que contienen escasos bacilos, pero, a la vez, es menos específico.

Con ambos cartuchos, y más notoriamente con el Ultra, la especificidad es menor entre pacientes con historia de TB previa debido a que puede detectar bacilos remanentes después de la quimioterapia, inactivos. No se ha determinado el plazo durante el cual se pueden detectar falsos resultados positivos luego de finalizado un episodio de TB. Por esta razón, el sistema no debe ser empleado para evaluar la eficacia del tratamiento en un paciente bajo quimioterapia, aunque puede ser empleado durante el tratamiento para detectar la aparición de RR.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Por estas razones, la investigación de las muestras debe ser completada con el cultivo, especialmente para detectar TB con muestras paucibacilares, para dar mayor sustento al diagnóstico de pacientes previamente tratados, y también para permitir realizar la PS a drogas diferentes de R. Si el volumen de la muestra es suficiente, puede ser dividida para procesar una parte mediante Xpert y otra mediante cultivo. Si no es suficiente, se debe procurar al menos dos muestras del paciente toda vez que sea posible, una para ser procesada por Xpert y la otra para ser cultivada. En el caso de líquido cefalorraquídeo con escaso volumen, se prefiere el procesamiento mediante Xpert dada la urgencia del diagnóstico.

Se describen aquí los procedimientos vigentes en el momento de redacción de esta Guía, pero podrían variar si el fabricante introduce modificaciones en el sistema.

Materiales provistos por el fabricante

- Reactivo de muestra (SR por las siglas de su nombre en inglés *sample reagent*),
- Pipetas estériles, plásticas, desechables, graduadas, para la transferencia de la muestra,
- Cartuchos conteniendo los reactivos de amplificación y detección.

Material biológico a investigar

Se puede investigar cualquiera de los siguientes materiales

- Al menos 1 ml de una muestra de esputo, que no contenga restos visibles de alimentos,
- Al menos 0,5 ml del sedimento de una muestra descontaminada y centrifugada con el procedimiento empleado el cultivo, resuspendido en buffer fosfato pH 6,8 en un tubo graduado con tapa a rosca (ver parte 2 de este Manual, Cultivo),
- El total de una muestra de líquido cefalorraquídeo cuyo volumen sea entre 0,1 ml y 5 ml, en un tubo graduado con tapa a rosca,
- El total de otra muestra semifluida con volumen entre 1 y 5 ml, en un tubo graduado con tapa a

rosca,

- El precipitado resultante de la centrifugación a 3000 g por 15 minutos de una muestra de líquido cefalorraquídeo u otras muestras semifluidas con volumen mayor a los 5 ml, en un tubo graduado con tapa a rosca,
- Al menos 0,7 ml del macerado de una muestra de tejido tomada con esterilidad por biopsia, transferido a un tubo con tapa a rosca graduado, evitando tomar restos que no se hayan podido disgregar (ver parte 2 de este Manual, Cultivo).

Procedimiento

Precauciones

- Para aprovechar la ventaja de la rapidez del método con toda su potencialidad, procesar la muestra en el mismo día en que es recolectada,
- Mantener las muestras de esputo preferentemente en refrigeración (2-8°C) antes de ser procesadas,
- Excepcionalmente, si fuera estrictamente necesario, las muestras de esputo, pueden ser mantenidas hasta 3 días a una temperatura máxima de 35°C, o durante 4-10 días en refrigeración,
- Mantener en refrigeración (2-8°C) los precipitados de muestras descontaminadas o centrifugadas antes de ser procesadas en el mismo día,
- Las muestras que no alcancen el volumen mínimo requerido pueden producir resultado falsamente negativo,
- Dado el mínimo riesgo biológico que genera la aplicación de este método, puede ser realizado con las condiciones de bioseguridad requeridas para la BK (ver parte 1 de esta Guía, Baciloscopia), excepto para procesar muestras que deben ser centrifugadas previamente o tejidos que deben ser macerados. En estos últimos casos, el procesamiento debe ser realizado dentro de CSB y con centrifugas seguras (ver parte 2 de este Manual, Cultivo),
- En el caso en que el método sea aplicado para esputos en laboratorios del nivel de atención primaria, de salud, con personal no entrenado para la transferencia de soluciones

y muestras, éste deberá ser adiestrado en los procedimientos necesarios para evitar la contaminación cruzada hasta el momento de cerrar el cartucho,

- no tocar con la manga de la bata envases con muestras
- empleo de maniobras suaves para evitar salpicaduras y aerosoles
- no tocar bocas o paredes de frascos o tubos conteniendo cada muestra
- descarte adecuado de cada pipeta luego de empleada
- cierre de cada frasco con tapa a rosca inmediatamente después de operar con el)
 - No abrir el cartucho del Xpert hasta el momento de agregar la muestra,
 - No utilizar cartuchos que estén húmedos ó dañados, que se hayan caído o que hayan sido agitados luego del agregado de la muestra,
 - No procesar muestras después de los 30 minutos de haber sido transferidas dentro del cartucho.

El número máximo de muestras que se puede procesar a la vez es el equivalente al número de módulos que estarán disponibles.

- Observar el volumen de la muestra,
- Volcar dentro del envase o del tubo conteniendo cada muestra el reactivo de muestra (SR) en las siguientes cantidades,

el doble del volumen de la muestra de esputo
el doble del volumen del precipitado de una muestra descontaminada

el doble del volumen del macerado de un tejido
volumen suficiente para completar 2ml en el caso de líquido cefalorraquídeo con volumen menor a los 0,5 ml

volumen suficiente para completar 2ml en el caso de un precipitado de una muestra centrifugada

- Cerrar herméticamente y agitar vigorosamente 10 a 20 veces cada frasco o tubo,
- Mantener a temperatura ambiente 15 minutos en total. Durante ese lapso, a los 5 a 10 minutos, agitar nuevamente, vigorosamente, 10 a 20 veces,
- Verificar que la muestra esté líquida, sin grumos visibles, particularmente en el esputo,
- Sacar el cartucho de su envoltorio, adherir el código de barras provisto, y escribir o adherir una etiqueta sobre el lateral de cada cartucho con el numero de cada material a investigar, cuidando no obstruir el código de barras,
- Con la pipeta provista por con el fabricante, aspirar la muestra ya tratada hasta llegar a la marca (2 ml),
- Abrir la tapa del cartucho y descargar la muestra dentro del compartimento, suave y lentamente evitando la formación de aerosoles,
- Cerrar la tapa del cartucho firmemente,
- Introducir el cartucho en el equipo,
- Verificar que el equipo y la computadora estén encendidas,
- Ingresar en el software, seleccionar en pantalla "Crear el test",
- Al aparecer la instrucción correspondiente, escanear el código de barras del cartucho cuyos datos serán ingresados automáticamente en los campos correspondientes (incluyendo lote y fecha de expiración),
- En el campo correspondiente, Introducir (o escanear si se emplearon etiquetas con código de barras) el numero de la muestra que se está procesando,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Seleccionar “Iniciar el test” y escribir la contraseña del operador,
- Abrir la puerta del módulo que muestra una luz titilando, ingresar el cartucho, y cerrarla,
- Cuando la prueba finaliza, la luz se apaga. Esperar que el sistema libere la apertura del módulo, abrirlo y retirar el cartucho.

Los remanentes de las muestras procesadas pueden ser mantenidos en refrigeración hasta 12 horas, para el caso en que se requiera repetir la prueba.

Lectura e interpretación de resultados

Es realizada automáticamente por el equipo y mostrada en la pantalla . El equipo procede para la interpretación considerando los siguientes resultados de los controles y de la muestra.

Controles internos

control del procesamiento de la muestra y de la presencia de inhibidores (SPC)

debe ser positivo en una muestra negativa, de lo contrario el resultado es clasificado como “invalido”

puede ser positivo o negativo en una muestra en la que se detecta el complejo control de sondas (PCC)

para que la prueba sea válida, debe producir señal antes del Ct estandarizado por el fabricante.

Resultados

de la muestra investigada		de los controles internos		interpretación
MTB	Resistencia a rifampicina	SPC	PCC	
DETECTADO	Alto (Ct <16)	DETECTADA	no aplicable	se ha detectado ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> clasifica la concentración de ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> detectada en la muestra según los valores de Ct que está en relación inversa con esa concentración se detectó una mutación en la región del gen rpoB investigada no se detectó una mutación en la región del gen rpoB investigada la concentración de ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> fue muy baja y su resistencia no pudo ser determinada la señal de este control no es requerida para interpretar los resultados cumple con criterio para la aceptación
	Medio (Ct 16-22)			
	Bajo (Ct 22-28)			
Muy bajo (Ct >28)	NO DETECTADA	pasó	pasó	no se ha detectado ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> cumplen con el criterio para la aceptación no se ha detectado el blanco de R investigado
Trazas (a)	INDETERMINADA	falló	falló	no se pudo determinar si está presente el ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> la muestra no fué procesada adecuadamente o existe algún inhibidor en la muestra
NO DETECTADO	NO DETECTADA	falló	falló	una o más sondas no cumplen con el criterio para la aceptación
INVÁLIDO	NO DETECTADA	sin resultado	falló	una o más de las sondas no cumplen con el criterio de aceptación, el tubo de reacción no fué llenado correctamente
ERROR	NO DETECTADA	sin resultado	pasó	pudo haber una falla en algún módulo o componente del sistema
SIN RESULTADO	NO DETECTADA	sin resultado	no aplicable	no se recolectó suficiente información para producir un resultado, la prueba puede haber sido detenida cuando estaba en proceso

(a) El resultado “trazas” es empleado sólo para el cartucho Ultra. Indica que se han detectado vestigios de ADN del complejo *M. tuberculosis*, y no se provee resultado acerca de la RR.

Es de difícil interpretación dado que en este resultado se concentran los falso positivos, más aún cuando se trata de pacientes antes tratados por TB.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

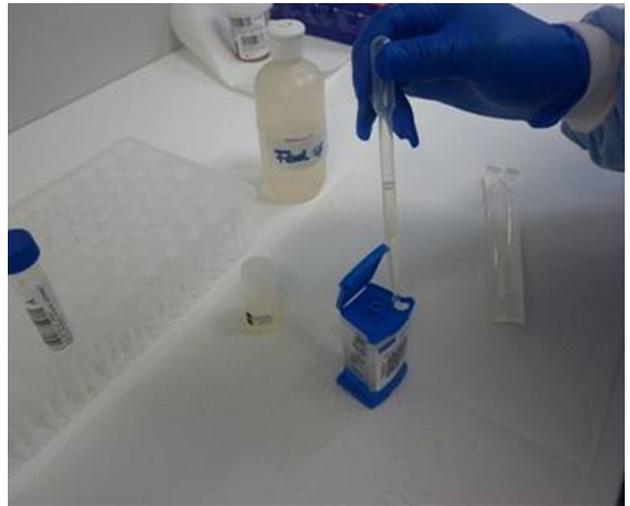
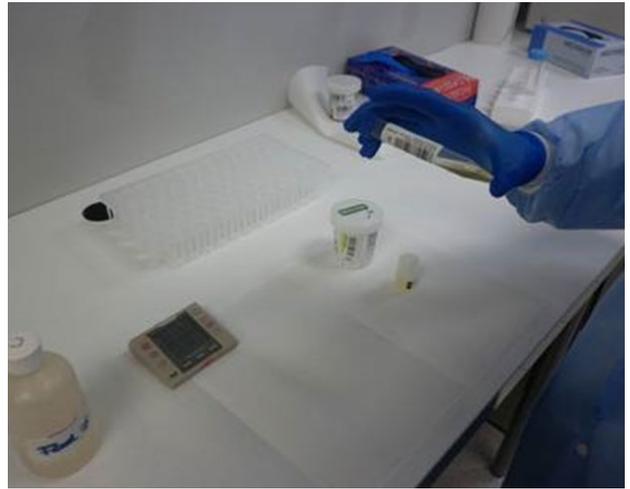
En este caso investigar una nueva muestra del paciente por Xpert y disponer que se cultive otra muestra. En el caso en que con la segunda muestra tampoco sea posible obtener un resultado definitivo sobre la RR por Xpert, o se detecte RR, se dispondrá la realización de la PS fenotípica. Para pacientes sin historia de TB previa, cuando se detecta por Xpert ADN del complejo M. tuberculosis en al menos dos muestras, son más firmes las bases para confirmar el diagnóstico de TB. Para pacientes con historia de TB previa, se debe mantener bajo consideración la posibilidad de que se hayan detectado bacilos inactivos y tomar las decisiones en base a la clínica y otros resultados bacteriológicos.

- Ante un resultado concerniente a la rifampicina que no es el esperado, considerando la situación epidemiológica o antecedentes del paciente, se recomienda repetir la prueba con otra muestra del paciente para descartar errores. Así, se debería repetir la prueba en los siguientes casos:
 - Un resultado RR obtenido con muestra de un paciente que no tiene factores de riesgo de resistencia identificados y que habita en un área geográfica o ámbito con baja prevalencia de resistencia a drogas antituberculosis,
 - Un resultado sensible a R correspondiente a un paciente categorizado como fracaso, o contacto de un caso con TB RR o MDR.
- Para interpretar las discordancias con la PS convencional, tener bajo consideración lo siguiente:
 - El Xpert detecta algunas mutaciones que generan resistencia *borderline* que, según cierta evidencia, está asociada a falla de tratamiento, y puede causar falsos resultados sensibles por el sistema MGIT 960/320,
 - El sistema no detecta mutaciones poco frecuentes que generan resistencia y están fuera de la región genética explorada,

- Los métodos moleculares, excepcionalmente, puede detectar mutaciones “silentes” (que no generan resistencia) las que pueden originar resultados falso-resistentes.
- Para dilucidar si este tipo de mutaciones han ocurrido es necesaria la secuenciación.
- Si el software informa “inválido”, “error” o “sin resultado”, repetir la prueba. Se puede reintentar con el remanente de la misma muestra, si hubiera quedado, y solicitar nueva muestra si el resultado se mantiene indefinido.

Obviamente, en el caso en que se confirme que un componente del equipo está dañado, será necesario proceder a su reemplazo o reparación.

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad



GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

LiPA

Principio

Los sistemas, de varias marcas comerciales, desarrollados con esta tecnología emplean PCR *multiplex* e hibridación reversa.

Amplifican segmentos de los genes donde se producen las mutaciones más frecuentes que originan resistencia a R (INNO-LIPA Rif TB, Genotype MTBDR plus y NTM+MDRTB Detection Kit 2, Nipro) y a I (Genotype MTBDR plus y NTM+MDRTB Detection Kit 2, Nipro). Además amplifican algún segmento específico del complejo *M. tuberculosis*; El sistema Nipro permite también diferenciar *M. avium*, *M. intracellulare* and *M. kansasii*.

Por otra parte, el sistema Genotype TBMDR *s/ v2* amplifica regiones de los genes donde se producen mutaciones que originan resistencia a FQN e inyectables.

Los amplicones biotinilados que se obtienen son depositados sobre tiras que tienen fijadas sondas, dispuestas en líneas paralelas. Esas sondas reconocen los segmentos genéticos investigados del bacilo sin mutaciones, y las mutaciones más frecuentes que aparecen en las cepas resistentes a las drogas investigadas.

Después de la hibridación, se agrega estreptoavidina marcada con fosfatasa alcalina. La estreptoavidina se une específicamente a la biotina atrapada en los híbridos fijados a las tiras (si es que se formaron). Luego, se agrega el sustrato de la fosfatasa unido a un colorante (BCIP/NBT, 5-bromo-4-cloro-3'-indolyfosfato y *nitro-blue tetrazolium*). La fosfatasa reacciona con este sustrato, resultando en un precipitado púrpura-marrón que, finalmente, permite detectar la hibridación visualmente. La ausencia de color, indica que no se ha producido la hibridación inicial.

La falta de hibridación de cualquiera de las sondas que representan a las regiones genéticas no mutadas es indicativa de que ha ocurrido una mutación en

los bacilos contenidos en la muestra del paciente que se está investigando. Esta mutación puede adicionalmente ser identificada por el sistema o no. La identificación de la mutación tiene ventajas desde el punto de vista clínico, ya que puede orientar acerca del nivel de resistencia desarrollado por la cepa, y puede permitir predecir alguna resistencia cruzada (ej. una mutación en el gen *inhA*, predice bajo nivel de resistencia a I y resistencia cruzada con etionamida).

El método es implementado con reactivos y POES provistos por los fabricantes.

Limitaciones

El sistema requiere una cantidad relativamente alta de ADN blanco para que pueda detectar al bacilo y sus mutaciones. El porcentaje de pruebas con resultados indeterminados puede ser muy alto con muestras paucibacilares. Por eso es recomendable que sea realizado con muestras con baciloscopia positiva y cultivos positivos.

Los equipos investigan las mutaciones más frecuentes que generan resistencia, pero no todas las que pueden ocurrir. En general, tienen mayor sensibilidad para detectar resistencia a R que para al resto de las drogas.

Son más frecuentes los resultados falso resistentes con inyectables.

El sistema Genotype TBMDR *s/ v2* investiga mutaciones que pueden generar resistencia cruzada entre FQN y entre inyectables utilizados para el tratamiento de TB. No determina la sensibilidad a cada droga individualmente.

Precauciones

La extracción de ADN puede generar aerosoles.

La extracción de ADN de cultivos positivos genera alto nivel de riesgo, debe ser realizado dentro del ACRB y dentro de una CSB.

El material extraído no debe ser sacado del ACRB hasta después de ser calentado e inactivado. Si existe un *pass through*, el material inactivado debe atravesarlo para continuar con su procesamiento por técnicas moleculares.

Los procesos que le siguen a la extracción e inactivación, no generan riesgo biológico, pero sí alto riesgo de contaminación cruzada con amplicones. Por lo tanto deben ser realizados fuera del ACRB y respetando un flujo unidireccional de muestras, procesos y del personal involucrado.

Cada uno de las etapas que se mencionan a continuación deberá ser realizada en ambientes separados del laboratorio de bacteriología y entre sí, no debe haber comunicación física entre esas áreas ni del aire que circula entre ellos.

Preparación de la mezcla de amplificación

Carga de ADN

Amplificación

Hibridación y revelado

La preparación de la mezcla para la amplificación debe estar apartada del laboratorio de TB y del área donde se revela la prueba LiPA.

La amplificación e hibridación /revelado podrían realizarse en un único ambiente, aunque es conveniente separarlos para no contaminar con amplicones los cicladores térmicos.

No se debe trasladar material al lugar donde se han hecho los pasos previos. Nunca se debe ingresar tubos con amplicones a ninguna otra área que no sea la de amplificación/revelado.

La ropa, elementos de protección personal, instrumentos y material de laboratorio deben ser exclusivos de cada área.

Las áreas de trabajo, equipos y todas las superficies que puedan ser manipuladas (incluidas las puertas, teléfonos, manijas de refrigeradores y congeladores, etc.) deben ser limpiados y descontaminados de manera regular utilizando prácticas y productos

de limpieza apropiados para eliminar amplicones. El personal que desarrolle las tareas posteriores a la extracción debe estar muy entrenado en la realización de procedimientos de biología molecular y en la interpretación de los patrones de bandas.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Equipos y materiales adicionales

Equipos y materiales adicionales	Area				Hibridación y revelado
	Extracción de ADN	Preparación mezcla de amplificación	Carga ADN	Amplificación	
microcentrífuga con rotor con tapa	X				
baño María o calentador con bloques	X				
sonicador	X				
baño María termociclador		X		X	
baño María con agitación o incubador					X
equipo para aspiración de líquido (*)					X
micropipetas	X	X	X		X
puntas para micropipetas					
libre de ADNsas y ARNasas	X	X	X		X
microtubos 2 ml estériles	X	X			
microtubos 0,2 ml para PCR estériles		X			
pinza					X
lápiz					X
Materiales provistos por el fabricante					
Mezcla para la amplificación		X			
Solución de desnaturalización					X
Tiras con sondas inmovilizadas					X
Solución de hibridación					X
Soluciones de lavado					X
Bandejas con canaletas formato para el pegado y lectura de las tiras hibridadas					X

(*) puede ser ensamblado en el laboratorio, por ejemplo con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.

Se puede emplear equipamiento provisto por los fabricantes de los LiPAs o equipo genérico para pruebas moleculares disponible en el laboratorio. La capacidad de los equipos debe ser adecuada a la carga de trabajo. La extracción de ADN y lectura de las bandas de hibridación pueden ser automatizadas con equipo adicional, lo que es conveniente para laboratorios con alta carga de trabajo.

Material biológico a investigar

- 1 ml del sedimento de una muestra , descontaminada , neutralizada con buffer fosfato pH 6,8 y centrifugada con el procedimiento empleado el cultivo, resuspendido en buffer fosfato pH 6,8 en un microtubo (ver parte 2 de este Manual , Cultivo),
- aislamientos de *M. tuberculosis* obtenidos por cultivo.
1 ml de medio líquido,
1ml de una suspensión en agua destilada estéril, preparada con la masa bacilar tomada con asa de toda la superficie de medio sólido.

Procedimiento

Para cada equipo comercial, se deben seguir los POES provistos por su fabricante

Se describen a continuación los procedimientos correspondientes al sistema Genotype MTB DR *plus* v2.0, que permite detectar simultáneamente resistencia a R e I, porque es el sistema con el que se ha desarrollado mayor experiencia en la Región hasta el momento de redacción de esta Guía. Los procedimientos podrían variar si el fabricante introduce modificaciones en el sistema.

Extracción de ADN

- Concentrar las bacterias del material a investigar mediante centrifugación a 10.000 -13.000 g durante 15 minutos, en microcentrífuga,
- Desechar el sobrenadante en un frasco cerrado,
- Re-suspender el precipitado en 100 microlitros de agua destilada estéril libre de DNAsas,
- Incubar en baño Maria o calentador con bloques durante 20 minutos a 95°C. Emplear gradillas de polipropileno, o piezas flotantes de poliestireno (con distintos nombres en distintos países como telgopor, isopor, unicel, icopor, tecnopor, anime poliespuma, etc) en las que se hacen perforaciones del tamaño adecuado para sostener firmemente los microtubos,

- Tratar durante 15 minutos en un sonicador,
- Centrifugar durante 5 minutos a máxima velocidad,
- Transferir el sobrenadante a otro microtubo,

Nota: Es posible realizar la extracción de ADN utilizando equipos comerciales que permiten prescindir del uso de sonicador.

Preparación de la mezcla de amplificación

- Por cada material a amplificar, incluyendo el control negativo, mezclar en el día de uso.
10 microlitros de la solución A
35 microlitros de la solución B.
- Alicuotar 45 microlitros de la mezcla en microtubos para PCR.

Carga de ADN y amplificación

- Rotular los microtubos para PCR conteniendo 45 microlitros de la mezcla de amplificación con el número de cada uno de los materiales a investigar, más un control negativo,

Si se investiga una muestra de un cultivo positivo, con micropipeta, añadir 5 microlitros de solución de ADN al tubo de PCR correspondiente,

Si se investiga una muestra descontaminada, con micropipeta, añadir 10 microlitros de solución de ADN al tubo de PCR correspondiente,

Para el control negativo (o de contaminación) añadir 5 microlitros de agua, en lugar del ADN, al tubo de PCR correspondiente,

- Ubicar los microtubos en el ciclador térmico,
- Seleccionar el programa indicado por el fabricante.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Los programas están estandarizados para el ADN polimerasa empleada por el fabricante. Si se emplea otra, el tiempo del primer paso podría tener que ser modificado, según lo aconsejado para la enzima que se emplee.

	muestras de cultivos	muestra directa del paciente
15 min 95°C	1 ciclo	1 ciclo
30 seg 95°C 2 minutos 65°C	10 ciclos	20 ciclos
25 seg 95°C 40 seg 50°C 40 seg 70°C	20 ciclos	30 ciclos
8 mm 70°C	1 ciclo	1 ciclo

- Finalizada la amplificación, ordenar sistemáticamente según sus números las muestras en una gradilla.

Hibridación

- Precalear el baño de agua con agitación o incubador a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,
- Calentar las soluciones HYB y STR a $37-45^{\circ}\text{C}$ antes de usar y mezclarlas. Los reactivos deben estar libres de precipitado,
- Calentar a temperatura ambiente los restantes reactivos, con la excepción del CON-C y el SUB-C,
- Usando un tubo adecuado, diluir el Conjugado Concentrado (CON-C, naranja) y el Sustrato Concentrado (SUB-C, amarillo) 1:100 con sus buffers respectivos,
CON-C con CON-D
SUB-C con SUB-D
Por cada tira añadir 10 microlitros de concentrado a 1 ml del buffer respectivo. Preparar solo la cantidad total necesaria para las reacciones a realizar en el día, inmediatamente antes de su uso.
Mezclar bien y equilibrar a temperatura ambiente.

Dispensar 20 microlitros de la Solución de Desnaturalización (DEN, azul) en una esquina de cada una de las canaletas de la bandeja, una por cada muestra investigada mas una para el control negativo.

- Manteniendo el orden de la gradilla, agregar en canaletas consecutivas 20 microlitros de cada muestra amplificada, pipeteando hacia arriba y abajo para mezclar bien con la solución de desnaturalización, pero evitando generar aerosoles,
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos,
- Entretanto, empleando guantes y una pinza, sacar las tiras de sus tubos Identificarlas escribiendo debajo de la marca coloreada, los números de cada muestra amplificada y del control negativo, manteniendo el orden de la gradilla,
- Añadir cuidadosamente a cada canaleta 1 ml de buffer de Hibridación (HYB, verde) precalentado. Agitar suavemente la bandeja hasta que la solución tenga un color homogéneo. Realizar esto muy cuidadosamente para no transferir la solución a las canaletas cercanas,
- Con la pinza, colocar cada tira en su correspondiente canaleta, con las sondas hacia arriba (el marcador coloreado hacia arriba). Las tiras deben quedar completamente sumergidas. Usando pinzas, se pueden dar vuelta a las tiras que pudieran haber girado durante su inmersión,

Limpiar cuidadosamente las pinzas después de cada uso para evitar contaminación,
- Poner la bandeja en el baño de agua con agitación o en la plataforma/ incubador durante 30 minutos a 45°C . Ajustar la frecuencia de agitación para lograr una mezcla completa y constante de la solución. Para la adecuada transferencia de calor, la bandeja debe estar sumergida en el agua, al menos, 1/3 de su altura.

- Retirar del baño y aspirar completamente el buffer de Hibridación,
- Añadir 1 ml de Solución de Lavado Astringente (STR, roja) a cada tira,
- Incubar durante 15 minutos a 45°C en un baño con agitación o incubador.

Desde este paso, en adelante, trabajar a temperatura ambiente

- Eliminar completamente la Solución de Lavado Astringente, Desecharla en un contenedor. Terminar de eliminar todo el líquido restante inclinando la bandeja suavemente sobre un papel absorbente. Repetir esto en todos los demás pasos de lavado.
- Lavar una vez cada tira con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) durante 1 minuto, sobre la plataforma con agitación del incubador. Eliminar el RIN,
- Añadir 1 ml de Conjugado diluido (ver más arriba) a cada tira e Incubar durante 30 minutos sobre la plataforma con agitación,
- Eliminar la solución y lavar cada tira dos veces durante 1 minuto con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN), y de nuevo durante 1 minuto con aproximadamente 1 ml de agua destilada (puede emplearse una botella para lavado). Trabajar sobre la plataforma con agitación del incubador, desechando la solución cada vez,
- Asegurar la eliminación de cualquier resto de agua después del lavado anterior,
- Añadir 1 ml de sustrato diluido (ver más arriba) a cada tira e incubar sin agitación, protegiéndolas de la luz,
- Dependiendo de las condiciones [por ej. la temperatura ambiente], el tiempo de incubación del sustrato puede variar entre 3 y 20 minutos. Si el tiempos de incubación del sustrato es muy

prolongado, se puede incrementar la tinción del fondo lo que, a su vez, podría dificultar la interpretación de los resultados,

- Detener la reacción en cuanto las bandas sean visibles, lavando brevemente dos veces con agua destilada,
- Usando pinzas, sacar las tiras de la bandeja y secarlas entre dos capas de papel absorbente.

Lectura e Interpretación de resultados

- Alinear y pegar las tiras en los formularios provistos por el fabricante. Protegerlas de la luz,
- Escanear o fotografiar la imagen de las tiras para guardar el registro de los resultados por un tiempo prolongado. Las líneas se decoloran con el transcurrir de los meses,
- Emplear el instrumento para la evaluación provista por el fabricante. Para verificar las reacciones correspondientes a cada locus, alinear previamente el instrumento con la banda control correspondiente,
Control de Conjugado (CC)
Control de Amplificación [AC]
M. tuberculosis complex [TUS]
rpoB Locus Control
katG Locus Control
inhA Locus Control

Verificación de los controles

CC

debe aparecer una línea en esta zona, indica la actividad del conjugado unido y la reacción con el sustrato.

AC

Si aparece esta banda, se pueden excluir errores en la extracción y amplificación, además de inhibidores de la amplificación.

Cuando se detecta ADN en la muestra ensayada (resultado positivo), la señal del AC puede

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

ser débil e incluso desaparecer, debido a la competencia con el ADN de la muestra durante la amplificación. En este caso, la reacción de amplificación se realizó correctamente y el ensayo no debe ser repetido. La ausencia de la banda AC en caso de una prueba negativa, indica errores durante la amplificación o la presencia de inhibidores en la muestra. En este caso, el ensayo no es válido y se debe repetir la prueba con la muestra correspondiente.

TUB

Si no aparece esta banda, la bacteria investigada no pertenece al complejo *M. tuberculosis* y no puede ser evaluada mediante este sistema.

Control de los locus (*rpoB*, *katG*, y *inhA*)

Detectan una región de cada gen y siempre deben ser positivas, cuando la banda de TUB haya indicado la presencia del complejo *M. tuberculosis*.

Control negativo

La aparición de bandas TUB y de control de los locus *rpoB*, *katG*, y *inhA*, en la tira empleada para el control negativo, indica la existencia de contaminación cruzada. Esto invalida todos los resultados obtenidos hasta que se verifique que ese tipo de contaminación se ha eliminado.

Verificación de mutaciones

Sondas *Wild type*.

Solamente serán consideradas como positivas las bandas cuya intensidad sea igual o mayor que la banda de AC.

Como excepción, se ha recomendado que la banda *rpoB* WT8 debe ser considerada positiva aun cuando sea más débil que la AC si, simultáneamente, no aparece la banda correspondiente a la mutación *rpoB* MUT3.

Cuando todas las sondas *wildtype* de un gen son positivas, no se detectan mutaciones en las regiones examinadas.

La ausencia de señal en al menos una de

las sondas *wildtype* indica la presencia de mutación y se infiere que la cepa investigada es resistente al respectivo antibiótico.

Una ó más mutaciones detectadas con las sondas *katG* permite(n) inferir resistencia de alto nivel a I, mientras que la(s) que se detecta(n) con las sondas *inhA* hacen inferir resistencia de bajo nivel a I.

Sondas que identifican las mutaciones específicas más frecuentes.

Solamente deben ser consideradas las con intensidad igual o mayor que las del AC.

Comparadas con otras muestras, las señales positivas de las sondas de mutación *rpoB*MUT2A y MUT2B pueden mostrar una señal más débil.

Cuando aparece la banda que identifica alguna de las mutaciones más frecuentes, la sonda correspondiente de la región no debe haber hibridado, es decir debe aparecer sin señal, a menos que exista heterorresistencia o mezcla de cepas en el material investigado.

El resultado es indeterminado cuando los controles indican que la prueba es válida, pero las bandas que indican la presencia o ausencia de mutaciones no pueden ser interpretadas, por ejemplo, por ser débiles o estar totalmente ausentes.

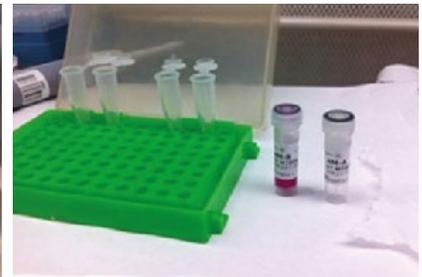
El material con resultado invalido o indeterminado debe ser ensayado nuevamente.

Para interpretar las discordancias con la PS convencional, tener bajo consideración lo siguiente:

- El sistema no detecta las mutaciones menos frecuentes que generan resistencia y están fuera de las regiones genéticas exploradas,
- Excepcionalmente, los métodos moleculares pueden detectar mutaciones "silentes" (que no generan resistencia) que pueden originar resultados falso-resistentes,

PARTE 3 Pruebas de sensibilidad

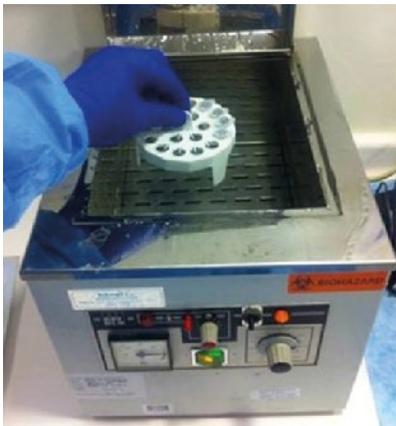
- Una muestra puede contener una cepa heterorresistente. En este caso se pueden detectar tanto una secuencia mutada, como una secuencia *wildtype*. El método fenotípico puede detectarlo o no, dependiendo de la proporción de clones con las secuencias mutadas y no mutadas que haya en la muestra investigada,
- Una muestra puede contener más de una cepa de *M. tuberculosis* (ambas presentes en la lesión del paciente o como resultado de una contaminación de laboratorio). Si una de ellas está mutada y la otra no, la mutación puede ser detectada por el sistema, a la vez que aparecen todas las bandas *wildtype*, Si la resistencia se evidencia fenotípicamente o no, depende de la proporción de la cepa mutada y no mutada que hay en la muestra investigada,
- Algunas mutaciones múltiples pueden generar efectos paradójicos,



Preparación de la mezcla de amplificación

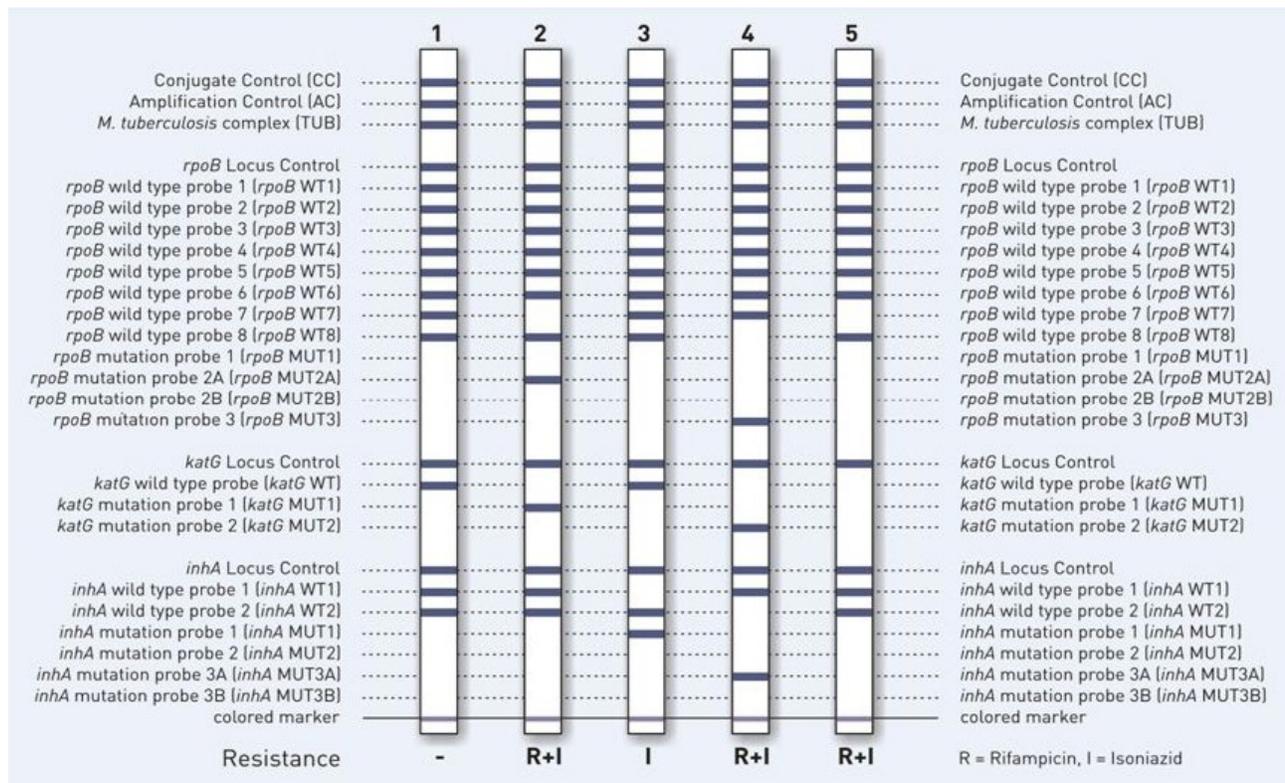


Hibridación



extracción e inactivación de ADN

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**



CONSERVACIÓN DE AISLAMIENTOS

El laboratorio de referencia necesita almacenar cepas de micobacterias por largo plazo, en condiciones que permitan preservar su viabilidad y características, para disponer de material de referencia, para sostener la vigilancia epidemiológica y para investigaciones. La preservación puede ser hecha por un período determinado o por el mayor tiempo posible.

Puede preservar aislamientos de origen clínico seleccionados por sus características de interés, o que hayan sido incluidos en un estudio determinado. Además, debe mantener las cepas de referencia entre las que pueden estar las que reciba de su Laboratorio Supranacional con perfiles de resistencia certeros. Se precisan varias alícuotas de las cepas de referencia utilizadas en la rutina de trabajo tanto del propio laboratorio como los que requieran los laboratorios de la red que no dispongan de equipamiento para la (ultra) congelación.

Todo aislamiento preservado debe estar codificado de manera que, a través del código, sea posible rastrear en los registros sus características morfológicas, bacteriológicas y moleculares, así como su origen y la información disponible de los casos de los que provienen. El empleo de código de barras facilita el proceso. Además, es necesario un registro que permita identificar rápidamente la posición en una caja y en el ultracongelador donde se ha ubicado cada aislamiento. Esto permitirá retirarlos rápidamente cada vez que se los necesite sin someter a descongelamiento o aumento de temperatura al resto de los aislamientos de la colección. En el registro constará también la fecha de congelamiento y medio en el que se ha preservado el aislamiento, así como las fechas de descongelamiento y los resultados de toda verificación que se haga de pureza o características.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Principio

El subcultivo seriado de un aislamiento puede originar mutaciones genéticas y, por ende, alterar sus características microbiológicas.

Los cultivos en medios a base de huevos pueden ser mantenidos a temperatura máxima de 20°C hasta por un año, pero los tubos empleados en la rutina ocupan mucho lugar. No es recomendable preservar sin congelar los cultivos en medios líquidos, durante más de 1-2 meses, porque el medio se deteriora más rápidamente y se contamina más fácilmente, además se forman en él grumos de bacterias que hacen que su concentración no sea predecible.

La viabilidad de *M. tuberculosis* declina mucho más rápidamente a temperatura ambiente que a -18 °C, y más rápidamente a esta última temperatura que a -70 °C: Por lo tanto, es conveniente emplear la menor temperatura posible para la preservación. Además, es conveniente preparar suspensiones de bacterias muy concentradas en el medio de preservación, para compensar la pérdida de viabilidad.

El descongelamiento y congelamiento reiterado disminuye la viabilidad de las bacterias, además de incrementar el riesgo de contaminación.

La viabilidad de las micobacterias ambientales es más prolongada y tiene menor exigencia que la de *M. tuberculosis*.

Material biológico

- Aislamientos de micobacterias de origen clínico, en medio sólido o líquido
- Cepas de referencia en medio líquido o en suspensión preparada a partir de medio sólido, con turbidez igual a mayor al patrón Mc Farland 1 (*ver en el capítulo de Pruebas de Sensibilidad en Medio Sólido de esta Guía la forma de preparar esta suspensión*)

Los cultivos deben ser jóvenes, (en fase activa de multiplicación), puros (sin contaminación ni de mezcla de distintas micobacterias) y abundantes. Los cultivos en medios líquidos deben tener turbidez igual o mayor al patrón Mc Farland 1

Medio

- Medio Middlebrook 7H9 enriquecido con ADC o leche descremada 10%, autoclavada a 110 °C durante 10 minutos

Material adicional

Para un aislamiento que puede ser descongelado sólo eventualmente

Por cada aislamiento a preservar

- 1 criotubo de 2 ml con rosca externa y tapa con protección de silicona o similar (o-ring), con rótulo persistente a la humedad y baja temperatura indicando el código del aislamiento a preservar y la fecha del repique.

Dependiendo de la importancia del aislamiento y la capacidad de almacenamiento, se puede decidir preservar 2 o más crio viales por aislamiento, en cuyo caso se ajustará la cantidad necesaria.

Para una cepa de referencia de uso habitual en el laboratorio

Por cada 10 alícuotas de la cepa

1 tubo de 25 ml

rotulado con el código de la cepa

10 criotubos de 2 ml

con rosca externa y tapa con protección de silicona o similar (o-ring),

con rótulo persistente a la humedad y baja temperatura indicando el código de la cepa a preservar y la fecha del repique.

La cantidad total de criotubos a preparar deberá ser ajustada a las necesidades del laboratorio

Procedimiento

- Trabajar en el ACRB, dentro de la CSB, respetando estrictamente los procedimientos para preservar la bioseguridad y esterilidad.
- Para un aislamiento que puede ser descongelado sólo eventualmente
- Dispensar 1,5 ml de medio Middlebrook 7H9 o leche descremada dentro del criotubo de 2ml,
- Tomar con un asa el desarrollo del medio sólido raspando toda la superficie del medio, o tomar con pipeta o micropipeta ó 0,2 ml del cultivo en medio líquido y transferir al criovial,
- Asegurar el cierre de la tapa del criovial,

Para una cepa de referencia

- Dispensar 15 ml de medio Middlebrook 7H9 o leche descremada dentro del tubo de 20 ml,
- Dispensar dentro de ese tubo 2 ml de la suspensión bacilar o del cultivo en medio líquido. Asegurar el cierre de la tapa del tubo,
- Homogeneizar en vortex,
- Distribuir 1,5 ml de esta suspensión en cada uno de los 10 criotubos vacíos.

Para todos los criotubos preparados

- Ubicar en una caja identificada con un número de serie,
- Ubicar en congelador a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por varios años, o en ultracongelador a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por décadas, ubicado en un ACRB,
- Si se ha preparado más de un criotubo por aislamiento de una cepa de referencia u otra cepa valiosa, es conveniente distribuirlos en distintos equipos de frío si se dispone de más de un (ultra) congelador, por si alguno de ellos sufre algún desperfecto.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Responsabilidades

La organización del laboratorio y adecuada distribución de tareas es fundamental para prevenir errores y demoras evitables.

Se debe asignar claramente cada una de las siguientes responsabilidades en profesional(es) y/ o técnico(s) muy entrenado(s) y experimentado(s):

- Preparación de medios de cultivos con drogas,
- Indicación de la serie de estudios a realizar en base a la historia y características de cada paciente, siguiendo algoritmos,
- Realización de cada procedimiento, registro de fechas y resultados de las PS (incluyendo los controles de calidad),
- Lectura e interpretación de resultados microbiológicos,
- Control e interpretación final de los resultados, considerando los antecedentes y características del paciente, confección y firma del informe,
- Supervisión, autorización o indicación de procedimientos especiales, cambios de POES, implementación de medidas correctivas.

El supervisor es responsable de conducir la gestión de calidad como un proceso superador y motivador, y la documentación del resultado de ese proceso. Debe verificar la disponibilidad adecuada de:

- manuales, guías técnicas y POES,
- algoritmos de trabajo,
- recursos humanos, equipamiento e insumos,

Para todos los aspectos que se evalúen se deben establecer indicadores y metas que permitan evaluar la calidad existente y su incremento paulatino.

También deben definirse los límites de aceptabilidad. El supervisor que conduce la gestión de calidad debe distinguir los errores.

- no aceptables y que deben determinar la suspensión de los informes o de una determinada actividad hasta que se documente que se ha retomado el nivel de calidad exigible (ej resultados no aceptables de un tipo de PS o para un antibiótico determinado),
- que pueden ser corregidos mientras se continúa con la actividad (ej. demoras evitables).

Los errores identificados orientan no solo las medidas correctivas sino también el diseño de programas de re-entrenamiento necesarios.

Procedimientos operativos estándares

Como método preventivo de errores, es necesario estandarizar cada procedimiento que se realice, tanto para operar en el laboratorio como para aplicar los métodos microbiológicos implementados y controlar su calidad. Los principales son:

- Ingreso de material biológico,
- Ingreso/egreso de personal al laboratorio y al ACRB,
- Algoritmos a aplicar según los antecedentes y características de cada caso
- Métodos para procesar material biológico,
- Reciclado de material,
- Tratamiento de desechos,
- Control de calidad interno y externo,
- Operación y mantenimiento de equipos,
- Elaboración de informes,
- Sistema de registro y archivo de documentos,
- Inventario de insumos y equipos,

Cada institución puede tener normas y un formato propios para la elaboración de POES, que deberán ser empleados por el laboratorio. Los POEs deben reflejar exactamente lo que se hace en la rutina de trabajo. Los siguientes ítems presentan la información básica que, usualmente, contienen los POES correspondientes a técnicas de laboratorio.

- Objetivo y alcance
- Definiciones y abreviaturas
- Calificación del Personal
 - Aptitud médica
 - Educación y entrenamiento
- Procedimientos
 - Principio
 - Condiciones de bioseguridad
 - Material biológico a procesar
 - Equipamiento y materiales necesarios
 - Reactivos y soluciones
 - Instrucciones detalladas del procedimiento
 - Lectura, registro y verificación de resultados
 - Control de Calidad
 - Otros procedimientos y

- documentos relacionados
- Bibliografía
- Cambios, fundamento de cada cambio

En las instituciones existen además POES de actividades transversales, comunes a todos o varios grupos de trabajo (para servicios de soporte general, mantenimiento y operación de equipos, administrativos, etc), que también integran el cuerpo de instrucciones que debe seguir el laboratorio.

Puntos de control críticos

Aplicación de algoritmos vigentes

El supervisor deberá controlar que se aplique el método o combinación de métodos más adecuado(s) según las características y antecedentes de cada caso clínico investigado mediante PS.

Cuando la carga de trabajo es muy elevada, se pueden seleccionar algunos casos para realizar este control. Resulta informativo rastrear retrospectivamente los antecedentes y procedimientos aplicados para los casos que presentan un desafío especial (con antecedentes de tratamiento antituberculosis, que hayan resultado resistentes a varias drogas, que hayan tenido curvas de crecimiento del sistema MGIT que expresan resultados dudosos, etc).

Periódicamente se podrá calcular el porcentaje de casos de los que se ha recibido material biológico sin información sobre su clasificación y tratamiento. No está relacionado con la calidad de trabajo del laboratorio. Sin embargo, si es elevado, el laboratorio debe contactar al Programa de Control de TB para desencadenar medidas correctivas en el sistema de salud. De otra forma, no es posible optimizar la aplicación de los métodos disponibles ni mantener la vigilancia continua de la resistencia a drogas antituberculosis.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Procedimientos técnicos y registros

Pruebas de sensibilidad fenotípicas

En la rutina, los operadores deberán:

- Controlar cada lote de medio de cultivo empleado para la PS,
- Mantener un registro sistemático de los resultados de este control, el que deberá ser revisado por el supervisor.

Cada lote de medio sólido que se prepare o que se adquiera comercialmente debe ser controlado mediante la realización de PS con una cepa de *M. tuberculosis* sensible a todas las drogas y resistente a cada uno de los antibióticos que integra el lote.

En el caso de emplearse medios líquidos, el control debería ser realizado cada día de trabajo, porque el medio con antibiótico se prepara en cantidad suficiente solo para esa jornada. En laboratorios que tienen alta carga de trabajo esto no es posible. Mínimamente se debería controlar cada lote de medio MGIT puesto en uso, y realizar luego, al menos, un control mensual si ese lote es utilizado durante varios meses.

Es posible emplear cepas que sean resistentes a más de un antibiótico para simplificar el procedimiento, pero, para disminuir el riesgo biológico, no deben emplearse aislamientos de *M. tuberculosis* MDR o XDR. Las cepas que se emplean para el control de calidad externo, provistas por los Laboratorios Supranacionales, son útiles para tal fin.

Si se detecta un resultado incorrecto con la(s) cepa(s) control, se deberá anular las PS realizadas con ese lote de medio y repetir las con un nuevo lote. Podría detectarse error sólo con alguna(s) droga(s), y entonces se anularán los resultados para esa(s) droga(s). También podría suceder que el único error que se detecta con un lote de medio es el de falsos sensibles. En ese caso se podrán informar los resultados "resistentes", pero deberán repetirse todas las PS con resultado "sensible". Y a la inversa

si se detectan sólo resultados falso resistentes. Eventualmente, algún lote de medios podría pasar satisfactoriamente el control de calidad con las cepas de referencia, pero, posteriormente, producir una serie sospechosa de resultados resistentes con alguna de las drogas, por deterioro. El supervisor debe estar atento a este tipo de alarma.

Ante la evidencia de mala calidad del medio empleado para la PS, que tenga carácter de excepcional, se deberán verificar los siguientes puntos para identificar la causa:

- Calidad del medio sin antibiótico (ver el Capítulo Control de calidad de la parte 2 de este Manual dedicada al cultivo),
- Conservación de los antibióticos a la temperatura indicada por el fabricante dentro de desecadores y con sales desecantes,
- Precisión en el pesado y dilución de cada antibiótico, alicuotado, rotulado y preservación de soluciones stock en ultracongelador,
- Descarte del remanente de todo vial con solución stock que sea descongelado,
- Precisión en la dilución de la solución stock y volumen agregado el medio de cultivo,
- Refrigeración del medio con droga durante su almacenamiento,
- Limpieza y buen funcionamiento de refrigeradores y ultracongeladores.

Los errores con una tendencia dan indicio acerca de los puntos a investigar prioritariamente para identificar las causas.

Ejemplos:

Resultados falso sensibles con la cepa de referencia pueden estar causados por:

- exceso de droga en el medio de cultivo
- error sistemático de un laboratorista al leer, validar o interpretar los resultados.

Resultados falso resistentes con la cepa de referencia pueden estar causados por:

- mala conservación de los antibióticos o de los medios de cultivo,
- defecto de la droga en el medio de cultivo,
- error sistemático de un laboratorista al leer, validar o interpretar los resultados.

Los errores más erráticos pueden estar causados por procedimientos imprecisos en la preparación de los medios de cultivo o la realización de la PS.

Por otra parte, a partir de los registros, el supervisor puede verificar la calidad de:

- El inóculo
Puede mantener un registro del porcentaje de PS con resultado: contaminado, con desarrollo insuficiente o excesivo, con malas diluciones, etc.
- La identificación de *M. tuberculosis*, al menos para todos los casos en que se haya detectado resistencia a drogas antituberculosis
Se supervisarán los resultados de la prueba de identificación de cada uno de esos casos y de sus controles correspondientes.

El supervisor también debe verificar la calidad de los registros de resultados. Si la carga de trabajo es muy alta, podrá tomar una muestra al azar de las PS, en días también seleccionados al azar, para verificar sus registros.

En caso de utilizar medios sólidos, en esos días, se pueden visualizar las PS en incubación y las ya finalizadas para verificar si el registro de resultados intermedios y finales reflejan adecuadamente los siguientes ítems:

- Número exacto o estimación del número de colonias desarrolladas, aunque el aislamiento resulte sensible,
- Anormalidades en la morfología o velocidad de desarrollo o distribución (no homogénea) de las colonias,
- Presencia de líquido remanente y sobresiembra.

En el caso en que se realicen PS en medio

líquido se pueden seleccionar PS ya finalizadas y contrastar, para esos casos, los resultados y curvas de crecimiento archivadas por el equipo de lectura automatizada, con los resultados finales que figuran en la base de datos del laboratorio.

También se deberá verificar la calidad de los registros de temperatura de refrigeradores e incubadoras.

Pruebas de sensibilidad moleculares

El supervisor podrá

- visualizar en días seleccionados al azar los procedimientos para verificar el cumplimiento de los POES,
- revisar sistemáticamente los resultados de los controles (positivo, negativo, de contaminación) correspondientes a cada serie de muestras o aislamientos investigadas por cada operador,
- verificar la precisión en la transcripción de resultados al sistema de registro, al menos en días seleccionados al azar,
- monitorear y graficar periódicamente el porcentaje de resultados inválidos, no interpretables y errores; verificando si se encuentren dentro del rango esperable para cada método. La frecuencia con la que se realice este control dependerá de la cantidad de pruebas que realice el laboratorio.

Contaminación cruzada

El supervisor deberá

- Visualizar, en días seleccionados al azar, el cumplimiento de las buenas prácticas para minimizar el riesgo de transferencia de bacilos (ver pág. 49 de la parte 2 de este Manual dedicada al cultivo),
- Mantener la alerta ante resultados de PS realizados consecutivamente, o en el mismo día de trabajo, que evidencian un perfil de resistencia igual e infrecuente. En tal caso, se verificará si los antecedentes de los pacientes justifican ese

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

perfil. En caso contrario, deberá disponer que se repitan las PS a partir del primocultivo para descartar la posible contaminación cruzada.

En laboratorios con muy alta carga de trabajo y que han implementado técnicas de epidemiología molecular, es conveniente genotipificar una muestra mensual de los aislamientos investigados, y todos los aislamientos con perfil de sensibilidad infrecuente coincidente, para comprobar si hay identidad o no entre ellos. Si se detecta identidad que no sea coherente con la información epidemiológica de los casos involucrados, se deberán repetir las determinaciones, preferentemente con un nuevo aislamiento de cada paciente. También es necesario visualizar y corregir los procedimientos.

Demora

Con una frecuencia conveniente, según la carga de trabajo del laboratorio, evaluar:

- Demora entre la recepción del material y siembra de la PS,
Al menos 95% de las muestras recibidas para realizar una prueba molecular deberían ser investigadas en el día de recepción o el posterior.

Al menos 95% de los aislamientos que requieren PS en medio de cultivo deberían ser sembrados dentro de las 48 hs de recibido o de desarrollado en el propio laboratorio.

- Demora en la entrega de resultados,
Al menos 95% de los resultados deben haber sido entregados dentro de los siguientes plazos, a partir del día de su realización de la PS
42 días para PS realizada en LJ,
23 días para PS realizada en agar Middlebrook,
16 días para PS realizada en MGIT,
2 días para muestras investigadas por Xpert,
3 días para muestras o aislamientos investigados por LiPA.

Al menos 80% de los resultados resistentes a R e I detectados en medio de cultivo deben

haber sido informadas dentro de los
23 días para PS en LJ,
16 días para PS en agar Middlebrook,
7 días para MGIT.

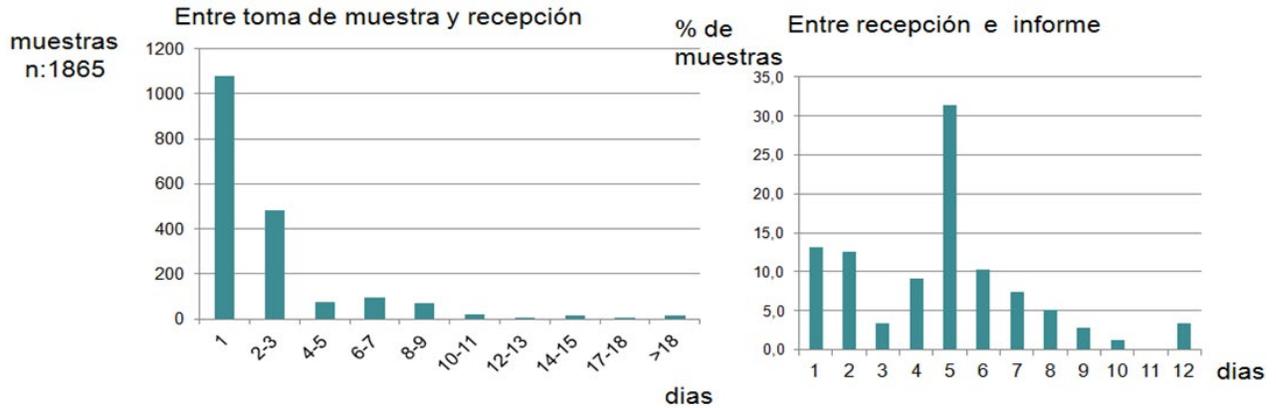
Idealmente también se debería analizar la demora entre la fecha de toma de muestra y disponibilidad de resultado de la PS (según el método), para identificar y contribuir a corregir tiempos excesivos que son de la responsabilidad del equipo de salud o del sistema de transporte de muestras. Si se evidencian tiempos excesivos, se puede estratificar el análisis (por área geográfica, laboratorio que remite el material, etc) para identificar donde es necesario hacer correcciones.

El análisis de demora también debe considerar la correspondiente a la detección de fallas y repetición de PS.

Es conveniente graficar estas demoras para facilitar su monitoreo.

Ejemplo 1:

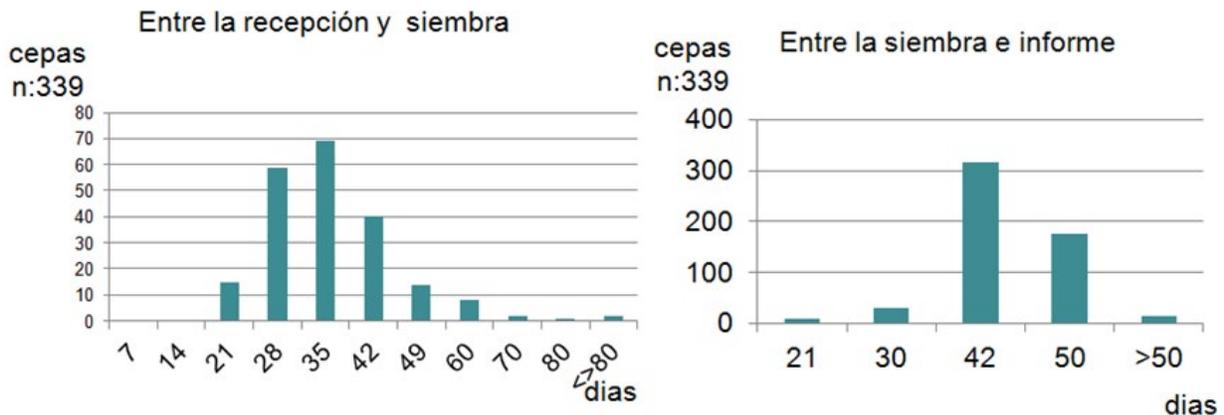
Análisis de demora
 Material investigado : muestras de esputo
 Método: GeneXpert MTB/RIF



Se presenta a la izquierda el número de muestras distribuidas según la cantidad de días que demoraron en llegar al laboratorio desde que fueron tomadas, y a la derecha el porcentaje de esas muestras distribuido según el número de días transcurridos desde la recepción del material en el laboratorio y el informe de resultados producidos por el sistema Xpert. Un muy alto porcentaje de muestras es recibido el día posterior o hasta 3 días después de la toma de la muestra. Esto podría ser aceptable si se concentran muestras desde varios centros más o menos alejados del laboratorio. Pero luego, tan solo 29% de los resultados fueron informados en el plazo aceptable (en el día de arribo de la muestra o en el siguiente), y esta no es una situación aceptable.

Ejemplo 2:

Análisis de demora
 Material investigado: Aislamientos de *M. tuberculosis*
 Método: Proporciones en LJ



GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

En este otro ejemplo queda en evidencia una demora totalmente inaceptable para sembrar los aislamientos que este laboratorio recibe para realizar el método de las proporciones. Además, si bien la mayoría de los resultados son informados en plazos aceptables para este método, es necesario verificar por qué se ha demorado 50 días o más, a partir de la siembra, para informar un porcentaje no despreciable de resultados.

Luego de este análisis es necesario discernir si la demora es evitable o es consecuencia de sobrecarga de trabajo y/o limitación de recursos humanos o equipos, para proponer la solución.

Las bases de datos diseñadas con *software* comercial (Excell, Access u otro), o elaborado especialmente para el laboratorio, simplifican y agilizan este tipo de análisis.

Informe de resultados

El supervisor y/o profesional responsable de firmar el informe deberá verificar:

- la correcta transcripción de resultados desde los registros al formato empleado para reportarlos,
- los resultados de los controles de calidad de los medios, reactivos y procedimientos correspondientes,
- la constancia en el formato del método empleado, drogas investigadas y , en el caso de que la PS fenotípica , las concentraciones ensayadas,
- la consistencia de los resultados y claridad de las observaciones, es decir la coherencia de los resultados producidos para un mismo paciente mediante PS realizadas con, muestras recientes aplicando distintos métodos (en el mismo laboratorio o en diferentes laboratorios de la red) muestras anteriores.

En caso de verificarse incoherencias (ej. resistencia a I detectada por método molecular y no detectada en el medio de cultivo, o resistencia a una droga detectada con una muestra anterior del paciente que ha desaparecido), se deberá informar que se han obtenido resultados inconsistentes con esa droga y disponer la repetición de la(s) prueba(s) partiendo nuevamente del primo aislamiento, si es posible, y/ o de otra muestra del paciente.

Si, luego de descartados posibles errores, la diferencia entre los resultados de distintos métodos puede ser explicada por limitaciones de alguno de ellos, el informe debería explicarlo, con lenguaje comprensible para el personal de salud, para orientar la interpretación. Por ej. si por el método molecular se detecta una mutación que determina resistencia *borderline*, pero la PS en MGIT 960/320 resulta sensible, se explicará que es muy posible que el aislamiento sea resistente a R y que el sistema de cultivo no haya detectado clones resistentes de desarrollo tardío. O en el caso de que no se haya detectado resistencia a I por método molecular pero si por PS en medio de cultivo, se explicará que muy probablemente el aislamiento sea resistente a I por alguna mutación no investigada por el método molecular empleado.

- la mención de los estudios pendientes para completar el perfil de sensibilidad o corroborar ciertos resultados (si se están realizando),

Esta es una responsabilidad profesional crítica para la calidad de trabajo. Informes incorrectos, inconsistentes o confusos tienen mucha gravedad porque pueden perjudicar el manejo clínico del caso.

Cabe mencionar que existe una Red Laboratorios Supranacionales que, bajo el paraguas de la Organización Mundial de la Salud, normaliza y coordina globalmente la evaluación externa de la PS y la vigilancia de la resistencia a drogas antituberculosis. Los Laboratorios Supranacionales también proveen soporte con material biológico de

referencia, y asesoría técnica para la implementación de métodos de PS en los LRN y, luego, su expansión en la red de laboratorios de la red.

Cuando un país ha establecido los nexos formales correspondientes, el LRN es supervisado, al menos una vez al año, por un Laboratorio Supranacional. Luego el LRN debe replicar ese control en todos los laboratorios de la Red Nacional que realizan PS y aceptan participar del programa de control de calidad (ver Manual de los Procedimientos de Evaluación Externa de Calidad de los métodos bacteriológicos aplicados al diagnóstico y control de tratamiento de la tuberculosis).

Este tipo de control está destinado a detectar errores graves, persistentes y generalmente sistemáticos. Pero no tiene potencia suficiente para identificar otros errores que pueden aparecer en la rutina, por lo que no reemplaza al control de calidad interno.

Bibliografía seleccionada

Brennan PJ and Young DB (ed) Handbook of Anti-Tuberculosis Agents Tuberculosis, 88: 1-169. 2008 <http://www.sciencedirect.com/science/journal/14729792/88/2?sdc=1>

Bwanga F, Hoffner S, Haile M, Joloba ML. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis. BMC infectious diseases 9:67. 2009

Canetti,G., Rist,N, Grosset, J. Mésure de la sensibilité du bacile tuberculeux aux drogues antibacillaires pour la méthode des proportions. Rev. Tuberc, 27: 217, 1963.

Espinal MA, Kim SJ, Suárez PG et al .Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcome in 6 countries. JAMA 283:2537. 2000

Global Laboratory Initiative. GLI model TB diagnostic algorithms. 2017. http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI_algorithms.pdf

Global Laboratory Initiative. GLI Quick guide to TB diagnostics connectivity solutions. 2016. http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_connectivity_guide.pdf

Global Laboratory Initiative. Mycobacteriology Laboratory Manual. Stop TB partnership, 2014. <http://www.who.int/tb/laboratory/mycobacteriology-laboratory-manual.pdf>

International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Priorities for tuberculosis Bacteriology Services in Low- Income Countries. 2nd. Edition. 2007. http://www.tbrieder.org/publications/books_english/red_book.pdf

Islam, M.M., Hameed, H.M.A., Mugweru, J et al. Drug resistance mechanisms and novel drug targets for tuberculosis therapy, Journal of Genetics and Genomics 2016 doi: 10.1016/j.jgg.2016.10.002

Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta,GA, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Diseases Prevention and Control. 1985.

Laszlo A, Rahman M; Espinal M; Raviglione M and the WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in the WHO/IUATLD Network of Supranational Reference Laboratories: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. Int J Tuberc Lung Dis 6: 748. 2003

Nasiri MJ, Haeili M , Ghazi M et al. Intrinsic and Acquired Drug Resistance Mechanisms in Mycobacteria. *Front Microbiol.* 2017;25;8:681. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5403904/pdf/fmicb-08-00681.pdf>

NCCLS. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard. .NCCLS document M24-A. USA. 2003

Organización Mundial de la Salud. Directrices para la vigilancia de la farmacorresistencia, 5ta edición 2015. WHO/HTM/TB/2015.13.

http://www.who.int/tb/publications/2015/drs_guidelines/es/

Organización Mundial de la Salud. Tuberculosis multidrogorresistente. Indicadores. Conjunto Minimo de Indicadores para el manejo programático de la TB-MDR en los PNCT WHO/HTM/TB/2010.11 .http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70720/1/WHO_HTM_TB_2010.11_spa.pdf

Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 1 Baciloscopia. 2008 <http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloscopia.pdf>

Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 2 Cultivo. 2008. <http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-cultivo.pdf>

Organización Panamericana de la Salud./ Organización Mundial de la Salud. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la tuberculosis. Sensibilidad del Mycobacterium tuberculosis a las drogas.

La identificación de Micobacterias. Nota Técnica N°28. 1986.

Schön T, Miotto P, Köser CU et al , Mycobacterium tuberculosis drug resistance testing: challenges, recent developments and perspectives, *Clinical Microbiology and Infection* 2016 .doi: 10.1016/j.cmi.2016.10.022

Van Deun A, Wright A, Zignol M et al. Drug susceptibility testing proficiency in the network of supranational tuberculosis reference laboratories. *Int J Tuberc Lung Dis.*2011 ;15: 116.

World Health Organization. Framework of indicators and targets for laboratory strengthening under the End TB Strategy <http://www.who.int/tb/publications/labindicators/en /WHO/HTM/TB/2016.18>. 2016.

World Health Organization. Maintenance Manual for Laboratory Equipment. 2nd edition. 2008. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43835/2/9789241596350_eng_low.pdf

World Health Organization. Non-commercial culture and drug susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis: policy statement. 2011. WHO/HTM/TB/2011.9. http://www.who.int/tb/publications/2011/mdr_tb_diagnostics_9789241501620/en/

World Health Organization. Treatment Guidelines for drug resistant tuberculosis. 2016 update. WHO/HTM/TB/2016.04. <http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/MDRTBguidelines2016.pdf>

World Health Organization . Guidelines for the programmatic management of the drug-resistant tuberculosis. 2011 update WHO/HTM/TB/2011.6 <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44597/1/97892415015>

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

83_eng.pdf

World Health Organization. Tuberculosis laboratory biosafety manual. WHO/HTM/TB/2012.11. 2012. http://www.who.int/tb/publications/2012/tb_biosafety/en/

Herramientas para el entrenamiento

Global Laboratory Initiative. Manual de capacitación en GeneXpert. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=37752&Itemid=270&lang=es

Global Laboratory Initiative. Training Package on DST by Phenotypic and Molecular methods. <http://www.stoptb.org/wg/gli/trainingpackages.asp>

Global Laboratory Initiative. Training Package on LPA. <http://www.stoptb.org/wg/gli/trainingpackages.asp>

Modelos de procedimientos operativos estándares

Global Laboratory Initiative. Standard operating procedures. <http://www.stoptb.org/wg/gli/sops.asp>

MEDIDAS MINIMAS DE BIOSEGURIDAD

En el segundo Capítulo de esta Guía (Organización de la oferta de la prueba de sensibilidad en la red de laboratorios) se ha presentado el nivel de riesgo y los requisitos mínimos de bioseguridad definidos por la Organización Mundial de la Salud en relación con cada método bacteriológico y molecular.

Las medidas de bioseguridad para laboratorios con nivel de riesgo biológico bajo y moderado han sido descritos con detalle en los Anexos I de las partes 1 y 2 de esta Guía dedicadas a la BK y cultivo respectivamente, los que deben ser revisados antes de leer este capítulo. Se consideran aquí sólo los requisitos adicionales y medidas recomendables para los laboratorios que operan con alto riesgo biológico, es decir los que manipulan aislamientos (cultivos positivos) de *M. tuberculosis* para identificarlos o investigar su sensibilidad a drogas. Estos laboratorios, generalmente, concentran los aislamientos que son resistentes a las drogas antituberculosis lo que incrementa más aun el nivel de riesgo.

Aptitud del personal

Documentar para cada persona que trabaja en el ACRB (incluyendo la que haya sido contratada para tareas de limpieza o auxiliares):

- apto médico (al ingreso y luego de cualquier accidente) y vigilancia médica regular,
- conocimiento del riesgo al que está expuesto,
- conocimiento de los elementos de protección personal a utilizar en el ACRB, ajuste de respiradores, colocación/retiro de mascarillas (o activación/desactivación de respiradores más complejos si los hubiera)
- colocación/ retiro de guantes
- entrenamiento para operar los equipos que debe utilizar,
- habilidad para realizar maniobras seguras, para evitar la exposición y minimizar el riesgo biológico,
- conocimiento y aplicación de los POES que le competen,
- conocimiento y capacidad para ejecutar el plan de contingencia para el caso de accidente/incidente.

El entrenamiento debe estar a cargo del personal más experimentado. Hasta asumir todas las tareas para las que cada persona fue contratada, debería realizar tareas con grado creciente de riesgo biológico. En cada etapa se comprobará que el desempeño es adecuado. Se debe refrescar el conocimiento y re-evaluar el personal, al menos, anualmente.

Si el personal no puede operar con seguridad o reaccionar con serenidad y eficiencia ante un accidente/incidente, debería ser asignado a otro tipo de tarea. De la misma forma se debería proceder con personal que tiene alguna enfermedad u otra condición transitoria o permanente que conlleve incremento del riesgo de TB (infección por HIV, diabetes, embarazo, etc). En todos los casos se considerarán las reglamentaciones vigentes y la opinión médica.

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Aunque sea experimentada, una persona no debe trabajar sola en el ACRB, de manera que pueda ser asistida en el caso en que sea necesario. El personal de apoyo puede estar fuera del ACRB, siempre que pueda observar el ACRB a través de un panel de vidrio. Una alternativa es la instalación de cámaras de seguridad dentro del ACRB que permitan monitorear los procedimientos que allí se realizan desde fuera.

Se deberá mantener relación fluida con un médico especialista en el tratamiento de TB resistente a las drogas, y deberá estar expuesto el número de teléfono de contacto, para requerir inmediatamente su asistencia en el caso de accidente. Esta precaución es recomendable dado que las aseguradoras de trabajo no siempre cuentan con médicos especialistas que puedan reaccionar de inmediato en estos casos.

Infraestructura, instalaciones y equipamiento

La ubicación de las distintas tareas, según el nivel de riesgo que generan, los requisitos de las distintas áreas y del equipamiento deben seguir las pautas detalladas en la parte 2 de esta Guía, dedicada al cultivo. En este caso deben obligatoriamente aplicarse las recomendaciones que figuran en el, bajo el título “Escalamiento de la bioseguridad en laboratorios con alto riesgo biológico”.

La apertura y procesamiento de cultivos positivos de *M. tuberculosis* deberá ser realizada en un ACRB que, mínimamente, tenga las siguientes instalaciones y equipos:

- Ingreso por una antesala que separe el laboratorio donde se opera con mayor riesgo biológico del tránsito de gente y de otras áreas de la institución,
- Un sistema que dirija el aire desde áreas funcionalmente limpias a sucias y lo esterilice a través de un filtro HEPA, antes de ser expulsado al exterior,
- CSB(s) que debe(n) estar conectada(s) a una batería o UPS para el caso de corte de energía

eléctrica,

- Autoclave dentro del ACRB o en un área lindante.

Un laboratorio pequeño puede servir de antesala o ésta puede ser instalada con cerramientos seguros, hasta el techo, y una puerta adicional. La antena mantiene la diferencia de presión de aire. Si no existe algún sistema de inyección de aire dentro del ACRB, el aire debe ingresar desde áreas funcionalmente “limpias” (donde no se opera con cultivos positivos), hacia las “sucias” (ACRB), a través de grillas ubicadas en la parte inferior de las puertas de la antesala. Es conveniente que estas grillas tengan pre-filtros para asegurar que ingrese aire limpio. También es ventajoso que las dos puertas de la antesala tengan cierre automático y un sistema de inter-bloqueo para que solo se abra una puerta por vez. La antesala también funciona como vestíbulo, para que el personal cubra la ropa de trabajo con la que circula fuera del ACRB, con ropa que se empleará sólo en el ACRB. Al egresar, esa ropa será desechada o ubicada en la antesala. Por lo tanto debe tener comodidades para separar ropa limpia de la usada en el área de riesgo (percheros, estanterías) y también son útiles los bancos para vestirse cómodamente. Pueden instalarse lámparas (tubos) UV de forma que sea posible irradiar con ellas, lo más cercanamente posible, la superficie de vestimenta y calzado que van a ser reutilizados. Deben ser accionadas luego de que se retire el personal. Las lámparas deben estar muy limpias y ser renovadas periódicamente para mantener su actividad germicida. Esta es una precaución para elementos que no han sido contaminados, al menos advertidamente. Todo material contaminado debe ser reemplazado y autoclavado de inmediato.

El aire del ACRB debe ser expulsado lejos del tránsito de personas y tomas de aire, asegurando 6-12 cambios por hora. Según las dimensiones del laboratorio y la cantidad de CSB que estén funcionando, el direccionamiento y la renovación del aire pueden ser logrados simplemente, instalando un ducto conectado a cada CSB que expulse el aire al exterior.

Para estimar preliminarmente si la extracción con ductos es suficiente, se puede calcular el volumen

del laboratorio y el del aire expulsado por hora por la CSB. Una CSB de 150 cm de ancho expulsa cerca de 500 m³/hora. Se calcula aplicando la fórmula:

Aire expulsado = área de ingreso de aire x velocidad del aire x tiempo en segundos

Ejemplo

CSB con una ventana que mide 1,50 m x 0,2 m y circula el aire a 0,5 m/seg

1 hora = 3600 segundos

Dimensiones del laboratorio 5 m x 10 m x 2,5 m de alto = 125 m³

Aire expulsado por la CSB por hora = 1,50 m x 0,2 m x 0,5 m/seg x 3600 seg = 540 m³/h

Para cambiar totalmente el aire del laboratorio 6 veces en una hora, se requiere expulsar 125 m³ x 6 = 750 m³, y para renovarlo 12 veces en una hora 125 m³ x 12 = 1500 m³.

Por lo tanto, en este laboratorio deberían funcionar mínimamente dos CSBs con el ducto conectado al exterior, o una CSB y un extractor adicional con filtro HEPA que expulse similar cantidad de aire.

Es recomendable contar con la asistencia de un profesional especialista en el manejo de aire para hacer mediciones y cálculos precisos.

Se prefiere el ducto de tipo "dedal", diseñado para las CSBs Clase II tipo A2, por sobre el "rígido", porque evita que se tengan que hacer ajustes a la CSB por fluctuaciones del aire. Además, en caso de interrupción o desequilibrio eléctrico, el aire que puede regresar al laboratorio, por disminución de la presión, no invade el filtro HEPA de la CSB. El ducto en dedal tiene forma de campana y se ubica sobre la cabina, dejando una abertura de unos 5 cm por donde es succionado el aire del ambiente, cuando la CSB está funcionando. Debe tener una pieza desmontable o que pueda ser abierta para permitir los controles y mediciones durante el proceso de certificación. También es recomendable, o necesario

en el caso en que el ducto sea de gran longitud, la colocación de un ventilador en el extremo externo del ducto. Toda la instalación debe ser realizada por personal calificado.

Sea cual fuere el sistema de manejo de aire, se requiere el monitoreo frecuente de su buen funcionamiento. Las verificaciones más simples de la dirección del aire pueden realizarse con pruebas de humo. Es ventajoso contar con medidores del flujo de aire.

El egreso del personal puede realizarse por la misma antesala por la cual se ingresa. Existen laboratorios más complejos con doble circulación que cuentan con sala de egreso diferente a la antesala de ingreso.

Para mantener el aislamiento y direccionalidad del aire, las ventanas deben estar selladas. Es conveniente que exista un panel con vidrio transparente que permita visualizar, desde fuera, las operaciones dentro del ACRB. Una de esas aberturas puede servir de puerta de emergencia (rompiendo el vidrio en caso de ser necesario).

La fuente regular de energía eléctrica de un laboratorio de este tipo debe ser confiable. Aun así, se deben instalar UPS debe asegurar al menos 15 minutos de autonomía del funcionamiento de cada CSB. De esta forma, ante una interrupción de energía de la fuente regular, el operador podrá cerrar los tubos o frascos que tuviera abiertos, descartar el material contaminado y desinfectar las superficies, antes de que se interrumpa totalmente el funcionamiento de la CSB.

Los pisos, paredes, puertas, marcos, iluminación y estructuras expuestas deben estar cubiertos con material resistente a la desinfección con químicos. Lo ideal es que sean continuas, sin juntas. No se deben adherir carteles o notas sobre las superficies que impidan su limpieza y desinfección. Tampoco debe haber plantas ni ornamentos de ningún tipo.

Además, debe haber al menos un lavamanos en cada laboratorio, con jabón desinfectante y toallas de papel, preferentemente cerca de la puerta de

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

salida. Toda vez que sea posible es conveniente instalar grifos que puedan ser operados con el codo o, si se asegura su mantenimiento, mediante sensores automáticos.

Las incubadoras (incluyendo los equipos con lectura automatizada), refrigeradores y freezers que contengan material biológico (potencialmente) infeccioso deben estar ubicados dentro del ACRB.

Son necesarios intercomunicadores o teléfonos que le permitan al personal que opera dentro del ACRB comunicarse con el exterior. El personal no puede ingresar/egresar equipos de telefonía móvil personal.

También son necesarios armarios y estantes adecuados para el almacenamiento ordenado y cómodo del material que debe ser empleado dentro del ACRB diaria o semanalmente, en cantidad suficiente (pero no excesiva). No debe haber cajas sobre el suelo, mesadas o equipos porque impiden la limpieza y desinfección de las superficies., restan espacio útil para el trabajo y generan riesgo. El almacenamiento de mayores cantidades de suministros debe ser organizado fuera del ACRB.

En el Anexo II se presentan las características generales del equipamiento requerido y de los equipos adicionales recomendables toda vez que se pueda acceder a ellos.

Elementos de protección personal

Las instituciones con procesos avanzados de gestión de calidad requieren que se documente la entrega y disponibilidad de elementos de protección para cada persona que se desempeña en el laboratorio.

Vestimenta

El plantel del laboratorio debe disponer de ropa de trabajo que le permita quitarse la ropa de calle y circular por las áreas generales del laboratorio. El personal que se desempeña dentro del ACRB deberá disponer de vestimenta adicional para esa

área que, mínimamente, consiste en:

- calzado o cubre calzado desechable (si no se emplea un overol que lo tenga),
- pantalones y chaquetas o mandil u overol,
- cofia de tela o desechable (si no se emplea un overol que lo tenga, opcional),
- unidades filtrantes de aire ó mascarillas/ cubrebocas que aseguren la filtración de M. tuberculosis (opcional),
- guantes.

Esta vestimenta debe reemplazar o proteger totalmente la ropa de trabajo con la que el personal circula en otras áreas del laboratorio. Nos puede ser utilizado fuera del ACRB. Deben estar en cantidad suficiente, ubicados en la antesala, y también dentro del laboratorio para poder reponerlo rápidamente en caso de incidente/accidente.

La vestimenta debe estar cerrada totalmente, particularmente en el frente. Las mangas deben ser largas y con puños elastizados. Puede ser confeccionada con tela reutilizable, o material desechable (fibras de alta densidad). En todo caso, el material debe ser suficientemente resistente a la tracción, rasgado y a la penetración de salpicaduras de cualquier tipo. Aunque sea reutilizable, la bata u overol debe ser inmediatamente reemplazado en el caso de un accidente con material (potencialmente) infeccioso.

El calzado reutilizable debe ser cerrado, de material impermeable y desinfectable. Alternativamente, se pueden usar cubre calzados desechables para proteger el calzado con el que se circula en otras áreas del laboratorio). Las botas para lluvia son una buena opción.

Para simplificar, conviene utilizar overol que tienen cofia y cubre calzado.

Protectores respiratorios

Proveen protección respiratoria adicional a la suministrada por el sistema de direccionamiento y renovación de aire y la CSB con buen funcionamiento certificado, pero de ninguna manera lo reemplazan. Son de uso opcional aunque

son muy recomendables, especialmente cuando se opera con medios líquidos y/o cuando se trabaja frecuentemente con cultivos farmacorresistentes.

Existen respiradores y unidades filtrantes más o menos complejos, incluso con sistemas motorizados de inyección de aire. Para el caso del ACRB de TB son perfectamente aceptables las mascarillas o cubrebocas tipo N95 (norma de Estados Unidos) o EN149.2001 (Norma de la Unión Europea). Deben estar en cantidad suficiente en la antesala y dentro del ACRB para reemplazos eventuales en el caso de deterioro.

Se comercializan equipos para comprobar el buen ajuste de cada modelo de mascarilla para cada operador, empleando sustancias sensoras, cuyo empleo es recomendable cuando el riesgo biológico es muy alto.

Se debe entrenar al personal en el uso de protectores respiratorios y seguir las instrucciones del fabricante para el empleo y operación de respiradores.

Para colocarse una mascarilla desechable nueva:

- Colocar primero la cofia (si se emplea),
- Tomar con una mano la mascarilla por la parte externa, dejando libres las tiras elásticas de ajuste,
- Posicionar la mascarilla cubriendo la nariz y boca,
- Tomar la tira elástica superior y ajustarla en la cabeza, por sobre las orejas,
- Tomar la tira elástica inferior, deslizarla rodeando la cabeza hasta ajustarla en el cuello,
- Ajustar la pieza metálica que se ubica sobre la nariz, presionando con los dedos desde la nariz hacia las orejas,
- Comprobar el ajuste de la mascarilla.

Para retirar la mascarilla:

- Quitarse primero los guantes (ver instrucciones abajo) y lavarse las manos,
- Quitarse luego la mascarilla tomando únicamente las tiras elásticas, sin tocar la parte externa de la mascarilla que es la potencialmente contaminada, ni la interna para no contaminarla,
- Desecharla en una bolsa autoclavable.

Es recomendable utilizar cada mascarilla una sola

vez. Sin embargo, si esto no es posible, y si no ha ocurrido ningún incidente/accidente en el momento de utilizarla, cada trabajador puede reutilizar su mascarilla, mientras permanezca funcional, es decir hasta que detecte que el ajuste no es perfecto, que las tiras elásticas se han relajado o que la respiración no es cómoda. Las instituciones pueden reglamentar la reutilización limitada a un número acotado de jornadas de trabajo, contemplando las indicaciones del fabricante y el nivel de riesgo.

Normalmente una mascarilla no debería estar contaminada con *M. tuberculosis* si fue empleada en un laboratorio con direccionamiento y renovación de aire, realizando las operaciones de riesgo dentro de una CSB con buen funcionamiento, sin que hayan ocurrido liberación de aerosoles o salpicaduras fuera de la CSB y sin que la mascarilla haya sido intencional o inadvertidamente tocada con los guantes con los que se manipuló material infeccioso. Sin embargo, en el caso en que se reutilice durante más de una jornada de trabajo, es necesario proveer mayor entrenamiento al personal para evitar contaminación por malas maniobras, y se debe prever la provisión de pares de guantes adicionales para seguir las siguientes instrucciones.

Para retirar la mascarilla luego del primer uso

- Guardar la mascarilla dentro de una bolsa de papel identificada con el nombre del trabajador al que pertenece.
- Colocar sólo una mascarilla dentro de cada bolsa y acondicionarla de forma tal que la mascarilla no sea aplastada.
- El nombre de cada operador también puede ser escrito en las tiras elásticas de la mascarilla, antes de ser utilizada por primera vez, para mayor seguridad.

Para colocarse una mascarilla a re-utilizar

- Colocar primero la cofia,
- Colocarse un par de guantes,
- Retirar la mascarilla de la bolsa,
- Colocarse y ajustar la mascarilla siguiendo re-pasos antes mencionados para una mascarilla nueva,
- Descartar los guantes en una bolsa autoclavable,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Colocarse otro par de guantes antes de ingresar al ACRB.

La mascarilla debe ser reemplazada inmediatamente si está dañada, si su ajuste no es perfecto, si impide la respiración confortable o si por algún accidente/incidente o por secreciones nasales se ha contaminado con aerosoles o salpicaduras.

Al desechar la mascarilla, desechar también la bolsa.

Guantes

Deben estar disponibles en la antesala y dentro del ACRB, en cantidad adecuada incluso para recambios ante algún hecho imprevisto. La provisión debe considerar los tamaños necesarios para que cada operador trabaje con comodidad.

Pueden ser de látex, vinilo o nitrilo. Deben cubrir el puño de la chaqueta u overol que se emplee. No pueden ser reutilizados.

Se debe instruir al personal para el empleo de guantes.

Antes del ingreso, en la antesala:

Si se reutilizan mascarillas, colocarse un par de guantes para colocarlas y descartarlos luego (ver instrucciones arriba),

Colocarse doble par de guantes, cubriendo los puños de la vestimenta antes de ingresar al ACRB.

Dentro del ACRB:

Descartar el par externo de guantes al terminar de operar con material infeccioso dentro de la CSB,

Colocarse un nuevo par de guantes externos y retirarlo a finalizar el trabajo dentro del ACRB.

Al egreso, en la antesala, quitarse el par de guantes remanente:

Tomar el puño de un guante y deslizarlo hacia fuera invirtiéndolo (la parte interna envuelve la externa) de forma tal que la posible

contaminación quede protegida,

Sostener ese guante recién sacado con la otra mano todavía enguantada,

Introducir el dedo desenguantado dentro del puño del otro guante (que todavía está colocado) sin tocar su exterior. Como antes, deslizarlo hacia fuera invirtiéndolo y, a la vez envolviendo el primer guante que se ha sacado,

Descartar los guantes en una bolsa autoclavable, Lavarse las manos con jabón desinfectante.

Botiquín para incidentes /accidentes

Debe estar disponible dentro del ACRB, visible e identificado, para que el personal responsable pueda reaccionar inmediata y rápidamente en caso de derrame o rotura de contenedores con material (potencialmente) infeccioso fuera de la CSB. Está compuesto por:

- paños absorbentes desechables,
- pinzas autoclavables o desechables,
- fenol 5% (en un frasco con buen cierre hermético) o desinfectante con acción similar, bactericida para *M. tuberculosis* en pocos minutos,
- 1 caja de guantes resistentes y gruesos, desechables,
- 1 caja de mascarillas (para esta situación son preferibles las mascarillas N99),
- bolsas autoclavables,
- caja o contenedor para material cortopunzante.

Además, es conveniente tener alícuotas de las soluciones madre de drogas de primera y segunda línea empleados para realizar la PS (al menos I, R, Mxf, aminoglucósidos). Si por accidente algún operador se produce una herida mientras manipula *M. tuberculosis*, se puede lavar rápidamente la zona afectada, presionar para hacer sangrar si es posible- Luego, recurrir rápidamente a esas suspensiones, mezclarlas, según el perfil de sensibilidad conocido o sospechado de la cepa que estaba manipulando, sin perder tiempo en diluciones o cálculos, y aplicar de inmediato sobre la herida, para luego recurrir a un médico especialista.

Prácticas en el laboratorio de contención de riesgo biológico

Los laboratorios deben tener POES precisos para el ingreso, operación dentro del ACRB y egreso de la misma, que dependen del grado de complejidad que tengan las instalaciones y de los métodos implementados, y que deben ser estrictamente seguidos.

Se enuncian a continuación los procedimientos que mínimamente deben ser respetados.

Ingreso

El acceso debe estar autorizado sólo para personal entrenado

No ingresar a la antesala con ningún elemento personal (bijouteri, reloj, teléfono móvil, etc) , ni empleado para trabajar fuera del ACRB,

Registrar el nombre del operador y hora de ingreso,

Si el laboratorio tiene pass-through, ingresar por allí las cajas con muestras y aislamientos,

Verificar el correcto funcionamiento del sistema de circulación de aire en los indicadores externos (si estuvieran instalados),

Comprobar que quede correctamente cerrada toda puerta que sea atravesada.

En la antesala:

- Inspeccionar la integridad de la ropa y elementos de protección a emplear,
- Colocarse la vestimenta de uso exclusivo del ACRB siguiendo las instrucciones arriba mencionadas,
 - pantalones y chaquetas u overol
 - calzado o cubrecalzado
 - cofia (si el overall no la tiene)

unidades filtrantes de aire ó mascarillas/cubrebocas

- doble par de guantes, cubriendo el puño de las mangas de la vestimenta

Dentro del laboratorio

Procesamiento del material biológico:

- Aplicar las recomendaciones para la bioseguridad enunciadas en la pag 49 y en el Anexo I de la parte 2 (Cultivo) de este Manual, además de las que específicamente se mencionan aquí,
- Emplear doble par de guantes. El par externo debe ser reemplazado al finalizar el trabajo dentro de la CSB y en el caso en que se contamine o rompa. Descartar el par externo dentro de la CSB toda vez que se la abandone,
- Mantener orden dentro de la CSB,
- Separar dentro de la CSB el material “limpio “ del (potencialmente) infeccioso (por ejemplo a la izquierda y a la derecha del operador respectivamente),
- Limitar el número de materiales a procesar a la vez, no abarrotar la CSB,
- Mantenerse alerta para resistir la tentación de tocarse la nariz, ojos o piel expuesta con las manos, con la vestimenta o con instrumentos en uso. Colocarse un par de guantes estériles externo, o solicitar asistencia de un compañero de trabajo para hacerlo en caso en que sea realmente necesario,
- Utilizar puntas de micropipetas protegidos contra aerosoles.

Toda vez que sea posible, elegir cepas control pansensibles y avirulentas

Cuando sea necesario emplear cepas control resistentes a los fármacos, no emplear M. tuberculosis MDR ni XDR para no incrementar más aun el riesgo biológico.

Registro de información

- Ingresar en computadora o tableta todo dato o imagen que sea necesario archivar. Emplear escáner en los casos en que sea necesario. Estos equipos deben estar conectados en red con computadoras de externas, para exportar la información, sin necesidad de trasladar registros físicos.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Descarte y reciclado de material

Deben respetarse las normativas vigentes en el país y en la institución para el desecho de material biológico patógeno y la preservación del medioambiente. Para el material que genera riesgo biológico, mínimamente deberán observarse las siguientes precauciones:

- Mientras se realizan los procedimientos del laboratorio, separar el material utilizado en

contenedores irrompibles y autoclavables (por ej. confeccionados con polipropileno o acero inoxidable).

Las bolsas y recipientes deben tener distintos colores, características y/o rótulos para clasificar el material desechable, cortopunzante, el material a reciclar y los químicos peligrosos.

	Material	Contenedor autoclavable
Desechable	Papel, guantes	Bolsas cerradas, ubicadas dentro de recipientes
	Asas , puntas de micropipetas, pipetas plásticas o hisopos empleados para operar con cultivos	Recipiente con tapa (frasco de vidrio o similar)
	Placas de Petri, con el cierre de sus tapas aseguradas con cinta adhesiva	Bolsas
	Frascos plásticos con muestras biológicas, con sus tapas cerradas	
	Sobrenadantes, resto de suspensiones bacterianas	Frascos con tapa
	Material o instrumentos cortopunzantes	Recipientes desechables, a prueba de perforación
A reciclar	Pipetas de vidrio	Pipeteros con tapa
	Tubos de vidrio ,con sus tapas cerradas	Recipientes con tapa,
	Frascos de vidrio con remanente de agua o reactivos, con sus tapas cerradas	

Las bolsas y contenedores autoclavables deben estar ubicados en cada puesto de trabajo. Los pipeteros y contenedores pequeños estarán dentro de cada CSB , los recipientes de mayor tamaño para tubos o placas pueden estar ubicados en una mesa de pequeño tamaño al lado de cada CSB . Se deberá constatar que la tapa de los tubos, frascos, placas y contenedores estén cerradas antes de descartar y transportar el material hacia el autoclave:

- No utilizar contenedores muy grandes, no compactar el material dentro de ellos, llenarlos sólo hasta sus dos terceras partes, para permitir que el vapor del autoclave penetre adecuadamente,
- Autoclavar diariamente el material a desechar y reciclar, luego de finalizada la tarea. No dejar acumular el material de varios días,

El personal que se desempeña dentro del ACRB es responsable de autoclavar el material si el autoclave se encuentra dentro de esa área, o de trasladarlo si el autoclave está en un área lindante. El traslado del material debe ser realizado en contenedores seguros, resistentes a golpes y herméticamente cerrados, desinfectados por su parte exterior. El empleo de carros ubicados fuera del área facilita la minimización de riesgo de caídas.

- Ningún elemento empleado dentro del ACRB puede egresar para ser desechado sin que sea previamente autoclavado. Esto debe ser respetado aun cuando el elemento no haya sido empleado con material (potencialmente) infeccioso. Queda incluida en esta precaución la papelería. Son excepciones:
 - Los desechos químicos explosivos o que generen contaminación ambiental, deben ser descartados siguiendo la reglamentación de cada institución, dentro de recipientes rotulados. Esos recipientes deben ser descontaminados en su parte exterior antes de ser retirados,
 - El material biológico no infeccioso que requiera procesamiento adicional fuera del ACRB (ej ADN). Debe ser colocado dentro de una caja

cuya superficie pueda ser descontaminada antes del egreso. El egreso será realizado a través del *pass-through* si está instalado.

Egreso

- Verificar el buen cierre de toda puerta que se atraviesa,
- Quitarse la ropa y elementos de protección personal,
- Descartar dentro de bolsas autoclavables los elementos de protección desechables (cofia, cubre calzados, mascarilla y guantes siguiendo las instrucciones arriba mencionadas, y overol desechables),
- Acondicionar los elementos de protección que van a ser reutilizados,
 - Desinfectar por fuera los respiradores o colocar dentro de bolsas de papel individuales las mascarillas, siguiendo las instrucciones arriba mencionadas
 - Colgar la vestimenta de tela en ganchos destinados para cada operador
 - Ordenar el calzado reutilizable de cada operador en armarios apropiados
- Lavarse las manos cuidadosamente con jabón desinfectante,
- Registrar la hora de egreso al área.

Limpieza y mantenimiento

La limpieza de puertas, aberturas, pisos, techo, muros, conductos externos, manivelas y llenado de dispensadores de toallas y jabón, etc. debe estar a cargo de personal entrenado para operar y emplear los elementos de protección personal, bajo supervisión

- Programar la limpieza en horas convenientes, cuando la actividad en el ACRB es nula,
- Emplear elementos desinfectables, que sean utilizados exclusivamente para esa área, organizar un armario para guardarlo,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Emplear paños y trapeadores desechables o autoclavables (en tal caso los trapeadores deben ser removibles de su bastón),
- Embeber los paños y trapeadores en solución detergente desinfectante, no limpiar en seco,
- Ubicar los paños y trapeadores o en recipientes o bolsas autoclavables, autoclavar antes de reciclar,
- Desinfectar los bastones, baldes y recipientes y guardar en el armario organizado dentro del ACRB.

El equipamiento en general, y especialmente las incubadoras, refrigeradores y congeladores que contengan material biológico (potencialmente) infeccioso deben ser limpiados por el personal entrenado que opera habitualmente dentro del ACRB.

Cuando sea necesario el ingreso de personal especializado para la revisión/repación de equipamiento, se deberá organizar la interrupción de tareas, la desinfección de todas las superficies y renovación completa del aire del ACRB (con el sistema de manejo de aire que se disponga). Los técnicos que ingresen deberán usar los elementos de protección que habitualmente emplea el personal y trabajar bajo supervisión.

Transporte de cultivos positivos

Revisar las recomendaciones detalladas en el Anexo de la parte 2 de este Manual dedicada al cultivo para el embalaje y transporte hasta el laboratorio de referencia de los cultivos positivos.

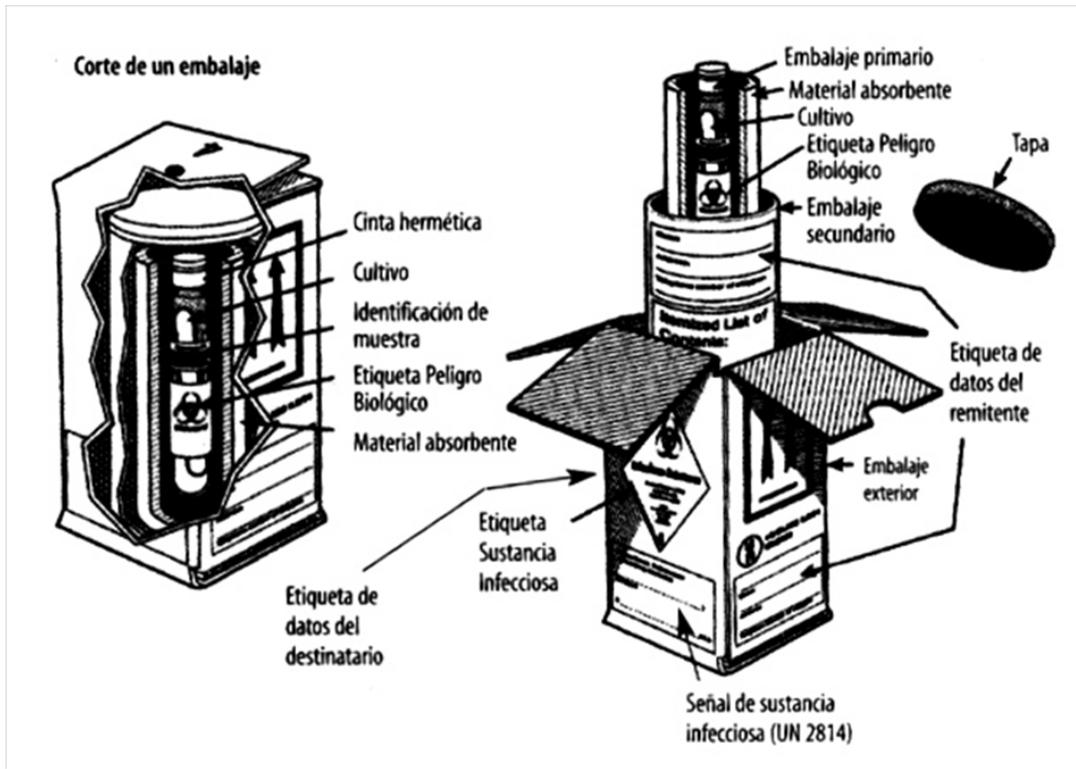
El transporte de este tipo de material debe ser realizado por una empresa autorizada para el transporte de material de riesgo biológico y cumplir con las regulaciones locales, nacionales y, si corresponde, las internacionales.

Se debe documentar, antes del envío, que el laboratorio receptor cumpla con los requisitos

mínimos de bioseguridad para operar con el material que se remite. No se deben hacer envíos internacionales hasta no comprobar que los receptores tengan las autorizaciones exigidas emitidas y hasta no tener la seguridad de que la encomienda será recogida lo más pronto posible en el aeropuerto. Se comunicará al destinatario la línea aérea, número de vuelo, horas y fechas de partida, número de guía de la encomienda y hora y fecha de llegada del vuelo.

Las recomendaciones para el transporte seguro son actualizadas periódicamente por el Comité de Expertos de las Naciones Unidas sobre el Transporte de Mercancías Peligrosas. En relación con la TB, las muestras tienen la calificación UN 3373 y los cultivos de *M. tuberculosis* UN 2814, categoría A (sustancias infecciosas que afectan a los humanos). La Organización de la Aviación Civil Internacional (OACI) utiliza estas recomendaciones como base para elaborar regulaciones para la seguridad del transporte aéreo. Por su parte, la Asociación del Transporte Aéreo Internacional (IATA) ha incluido exigencias adicionales.

(<http://www.iata.org/ps/publications/dgr/index.htm>)



Contenedores para la importación/ exportación y transporte de aislamientos de *M. tuberculosis*

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**



Antesala que separa al laboratorio de contención de riesgo biológico



Panel transparente que permite visualizar las actividades dentro del laboratorio de contención desde un área con bajo riesgo



Pass through, para el ingreso/egreso de material que no puede ser autoclavado



Ducto conectado en dedal sobre la cabina de seguridad biológica Clase II tipo A que genera presión negativa

ANEXO II

EQUIPAMIENTO

Se recomienda revisar los Anexos III y II de las partes 1 y 2, respectivamente, de este Manual dedicadas a la Baciloscopia y Cultivo, respectivamente. Se considerarán aquí los equipos más importantes o las características de los mismos no considerados en esos Anexos y que son necesarios o útiles para el laboratorio que realiza PS.

En general, el equipamiento más complejo de un laboratorio de alto riesgo biológico requiere de mantenimiento preventivo y correctivo a cargo de profesionales especializados. Debe ser programado para cada equipo y financiado.

Cuando se planea adquirir los equipos más complejos, de alto costo, es necesario asegurar previamente:

- espacio para el modelo del equipo adecuado para las necesidades del laboratorio sobre el piso o mesada o mesa, considerando la apertura de su(s) puerta(s) o cajones si los tiene y para la circulación de aire por derredor, sin afectar la circulación del personal,
- acceso del equipo por las aberturas existentes
- alimentación eléctrica y enchufes,
- acondicionamiento de la temperatura en forma estable, según los requisitos del equipo,
- nivel de ruido aceptable,
- considerando el que genere el equipo a adquirir sumado al existente
- instalación del equipo con funcionamiento verificado,
- entrenamiento del personal para su uso, interpretación de errores o fallas, limpieza y el mantenimiento preventivo que pueda estar a su alcance,
- garantía del buen funcionamiento durante al menos 1 año,
- actualización del software a la última versión disponible,
- si el equipo usa reactivos no genéricos, producidos por el mismo fabricante (ej. MGIT 960/320, GeneXpert), garantía de la disponibilidad de stock de reactivos requeridos por el laboratorio, con fecha de vencimiento adecuada y reposición inmediata en el caso en que algún lote fuera defectuoso,
- adquisición de accesorios opcionales
- (ej portatubos adecuados a la rutina del laboratorio para el equipo MGIT 320/960, convertidores de electricidad, UPS,
- la adquisición de repuestos cuyo recambio sea relativamente frecuente o cuya falta de disponibilidad inmediata pueda determinar la paralización de las tareas,
- (ej filtros de CSB, resistencias para autoclaves eléctricas, etc),
- servicio de mantenimiento regular, certificación del buen funcionamiento, asistencia técnica y reemplazo de componentes defectuosos inmediatos, en caso de desperfecto del equipo,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

el laboratorio podría quedar paralizado por falta de funcionamiento de algún equipo crítico (ej autoclave, CSB, refrigeradores/freezers). Cuando no existe capacidad técnica en el país para la verificación y mantenimiento de los equipos más complejos (particularmente CSB) es muy importante crearla. La experiencia conocida en la Región muestra que la contratación de servicios de otros países es onerosa y muy difícilmente puede ser garantizado con la periodicidad o urgencia requeridas. Aun con mantenimiento asegurado, se debe prever un plan de contingencia para el caso en que este tipo de equipo deje de funcionar temporariamente.

- referencias de usuarios (nacionales o internacionales) que ya posean el equipo,

Todos los requisitos deben ser explícitos y claros en la documentación que se requiere para el proceso de compra.

Ciertos sistemas priorizados por OMS para el control de la TB están accesibles a precios preferenciales para organizaciones gubernamentales y sin fines de lucro, de países que no son de ingreso alto, y/o pueden ser adquiridos mediante fondos estratégicos. Al precio preferencial hay que sumarle costos de transporte internacional y local, seguros, aduana e impuestos que aplica cada país. Es recomendable consultar y estar actualizado con este tipo de facilidades.

El empleo, calibración, control, validación y mantenimiento del equipamiento debe ser registrado en formatos estandarizados los que deben ser archivados. También deben ser archivados los registros que automáticamente producen los equipos más complejos o los sensores (por ej. de temperatura) que puedan ser agregados. Considerar que los registros no podrán egresar del ACRB sin autoclavado previo, por lo que es conveniente emplear softwares y bases de datos toda vez que sea posible, y escanear los documentos escritos. Este material deberá ser revisado por los responsables de calidad, bioseguridad y /o mantenimiento.

Por otra parte, son necesarios la organización y

establecimiento de un programa regular de limpieza del equipamiento, incluyendo los interiores de refrigeradores/congeladores e incubadoras.

El personal que se desempeña en el ACRB debe estar entrenado para operar todos los equipos que se encuentran en esa área, para realizar los procedimientos de mantenimiento que no requieren personal especializado y es responsable de la limpieza de todo equipo utilizado con material (potencialmente) infeccioso.

Computadoras, escáner

Como se ha mencionado repetidamente, para disminuir el riesgo es necesario contar con una a más computadoras y un escáner dentro del ACRB, conectados en red con otras computadora (s) e impresora ubicada(s) fuera del ACRB.

La(s) computadora(s) del ACRB pueden tener capacidad moderada ya que es posible vincularlas con una de mayor capacidad que estén fuera y que contengan las bases de datos y de imágenes, así como los softwares con los que se opere. La cantidad de computadoras debe ser pensada en función del número de operadores que se desempeñan en el ACRB, así como del espacio disponible. Así, pueden ser convenientes las computadoras portátiles y las tabletas para ingreso de datos.

Cabina de seguridad biológica

El modelo adecuado para laboratorios de alto riesgo biológico es Clase II tipo A2 porque tiene los ductos contaminados bajo presión negativa o rodeados por ductos con presión negativa. Como ya se ha comentado en el Anexo I de este manual, la(s) CSB(s) debe(n) estar conectadas a una batería o UPS, para el caso de corte de energía eléctrica y, en el caso en que no exista otro sistema para el direccionamiento del aire para la creación de presión negativa, deben tener anexado un ducto (preferentemente de tipo dedal) que remueva el aire hacia el exterior. Cuando es necesario prolongar el ducto exterior para que el aire sea expulsado lejos de edificios ocupados o tomas de aire, puede ser

necesaria la colocación de un ventilador externo. En ese caso, se puede optar por un ventilador que pueda seguir funcionando aun después de apagada la CS.

Cabina de esterilidad

Dentro o cerca del área de preparación de reactivos y medios es conveniente tener una cabina que proteja la esterilidad de las soluciones o medios que se preparan. Se puede utilizar una cabina existente que sea de uso común para varios laboratorios. Esto facilita y mejora el trabajo, en relación con el empleo de mechero(s) sobre la mesada, y es especialmente recomendable para laboratorios con mediana o alta carga de trabajo. También son, particularmente, necesarias para la preparación de medios muy enriquecidos como los de la serie Middlebrook o MGIT.

Pueden asegurar la esterilidad mediante el flujo de aire que atraviesa filtros HEPA con >99,99% de eficiencia para retener partículas de al menos 0,1 ó 0,3 µm. El aire filtrado es proyectado horizontal o verticalmente en el área de trabajo, No es necesario que filtren el aire antes de expulsarlo, y, si no lo hacen, no aseguran la protección del operador. Deben emplearse para trabajar con materiales que no generan aerosoles ni vapores peligrosos.

Deben tener una superficie de trabajo suficientemente amplia como para ubicar todo el material necesario para la preparación y envasado de medios de cultivo. Tienen tubos UV para esterilizar la superficie de trabajo y superficies de acero inoxidable, epoxy, poliuretano y/o polipropileno que permiten mantenerlos muy limpios y desinfectados. Cuando es necesario adquirirlo, verificar que tenga el número de enchufes para conexión eléctrica necesarios, bajo nivel de ruido, y buena iluminación en el área de trabajo.

Pass through

No es un requisito, pero es conveniente. Es una cabina de doble puerta que es ventajosa para pasar

material hacia o desde el ACRB, previa desinfección de la superficie del contenedor externo. Se monta en la posición más conveniente de un muro que separa el ACRB del resto del laboratorio, preferentemente alejado de las áreas donde opera el personal. Existen equipos con puertas que se inter-bloquean, de manera que sólo una de las puertas puede ser abierta por vez, para depositar o retirar material. También pueden tener alarmas audibles que indican la apertura de una de las puertas. Deben estar contruidos con material liso y desinfectable como el acero inoxidable.

Para el laboratorio de TB es adecuada una cámara de pequeño tamaño, suficiente para ingresar el material biológico que debe ser procesado dentro del ACRB, o para extraer material biológico no infeccioso resultante de los procesos aplicados dentro de esa área y que no puede ser autoclavado (ej. ADN). Eventualmente puede ser utilizado para ingresar insumos o reactivos de pequeño tamaño que, por cualquier causa no prevista, no estuviera disponible dentro. De esta manera se evitan todos los procedimientos que debe realizar el personal que se encuentra dentro del ACRB para egresar y buscar ese material.

Autoclave en área de contención de riesgo biológico

Debe tener el tamaño adecuado para autoclavar el material que diariamente debe ser extraído del ACRB, para desechar o reciclar.

Los autoclaves con una sola puerta son aptos. Si el autoclave está ubicado dentro del ACRB, es conveniente que sea eléctrico para evitar el calor excesivo y vapor dentro del ambiente de trabajo.

Toda vez que se tenga el espacio necesario y la posibilidad de adquirirlo y mantenerlo regularmente, es conveniente un autoclave con dos puertas, una que se abra hacia el ACRB y otra hacia el área de lavado de material. Este tipo de equipo tiene sensores electrónicos de temperatura y presión

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

cuyas mediciones son exhibidas en un panel de control y reportadas mediante un ticket impreso y/ o transmitidas a una computadora mediante un software. Normalmente son programables para que sea posible emplear distintos ciclos de esterilización, según el material que se haya colocado en su interior. El aire de la cámara es eliminado previo filtrado. Generalmente es necesario acoplar este tipo de autoclave con un sistema para purificar el agua que utiliza. Se pueden adquirir con carros para transportar el material y descargarlo cómodamente, así como bandejas para dejar la carga dentro del autoclave.

Refrigerador, ultra-congelador

Fuera del ACRB se requieren refrigeradores (1-8°C) para preservar medios de cultivo, drogas, soluciones y reactivos que requieren esa temperatura (según indicación del fabricante). Además, es necesario un congelador (independiente o como un compartimiento del refrigerador) que asegure -18°C o menos para preservar las soluciones de antibióticos. Deben ser ubicados en un área "limpia" cercana o, preferentemente, dentro de la dedicada a la preparación de medios de cultivo y reactivos. Son convenientes los refrigeradores que tienen puertas transparentes para identificar rápidamente los espacios donde está el material a extraer o introducir, minimizando el tiempo de apertura del equipo.

Dentro del ACRB se requiere refrigerador (1-8°C) para medios y reactivos, otro para material (potencialmente) infeccioso (muestras/aislamientos que están siendo investigados) y en laboratorios de referencia se precisa un congelador -18°C o preferentemente ultracongelador (-70°C), para preservar la colección de cepas/aislamientos a largo plazo.

Las siguientes son características muy convenientes: indicadores externos de temperatura, alarmas visuales y auditivas que indiquen la elevación de temperatura, mínima formación de hielo, suficiente y conveniente organización interna de estantes/cajones para facilitar el registro y control de

stock. Para laboratorios con alta carga de trabajo es conveniente la adquisición de equipos más sofisticados que permiten el registro y monitoreo de temperatura automáticamente, empleando un software propio. Alternativamente es posible agregar sensores y equipos externos que realicen este registro.

Microbalanza o balanza analítica

Son adecuadas para el pesado de antibióticos y la mayoría de los reactivos necesarios para pruebas moleculares, porque están diseñadas para pesar pequeñas cantidades, asegurando precisión en el rango de los submiligramos. Además, se pesa dentro de compartimientos cerrados que evitan el polvo, partículas ambientales y las corrientes de aire que pueden interferir. Se puede seleccionar entre varios modelos de acuerdo a la cantidad máxima y mínima que se requiera pesar en la rutina de trabajo. Para las necesidades de un laboratorio de TB que realiza PS, debe asegurar legibilidad y repetitividad en el orden de 0,01 mg ó menos. La limpieza, el nivelado y calibración exactos de una balanza son claves para conseguir resultados confiables. La balanza debe estar instalada en un área "limpia" (sin riesgo biológico), sobre una mesa muy firme y lejos de equipos que puedan causar vibraciones y corrientes de aire.

Micropipetas

Son necesarias para medir y transferir volúmenes de 1 ml o menos, asegurando una precisión de 1% o más. Se puede elegir entre varios modelos: uno o varios canales, manuales o electrónicas, para medir volumen fijo o variable, con distintos rangos y precisión. Se debe elegir modelos que aseguren fácil eyección de la punta plástica. Para el ACRB deben ser autoclavables, para el caso en que se contaminen accidentalmente. Rutinariamente deben ser desinfectadas con alcohol 70% luego de ser utilizadas, por lo que también deben resistir el desinfectante.

La mayoría de las micropipetas emplean puntas (tips) universales y genéricos, y son preferibles a

las que emplean puntas peculiares que pueden no estar disponibles en el mercado con oferta amplia y sostenida en el tiempo.

Para los métodos descritos en esta Guía que se realizan en el ACRB, normalmente son suficientemente adecuadas las micropipetas unicanal, manuales, con dispensado de volumen variable, una entre 10 µl y 100 µl y otra entre 100 µl y 1000 µl. Para la realización de LiPA, se agrega la necesidad de dos micropipetas que dispensen entre 10 y 100 µl en el áreas dedicadas a la preparación de mezcla de amplificación y carga de ADN. En el área de preparación de medios, sobre para el MGIT, es necesario otra micropipeta que dispense entre 100 µl y 1000 µl.

Para que mantengan la precisión con el uso prolongado, las micropipetas deben ser limpiadas siguiendo las instrucciones del fabricante y calibradas periódicamente.

Contador de personas o ganado

Puede ser electrónico o mecánico, incrementa de a uno la cuenta con cada pulso manual Facilita el conteo de colonias para el método de las proporciones.

Lupa

Con aumento 3-5x, manual o con pie, opcionalmente puede tener iluminación periférica. Facilita el conteo de colonias para el método de las proporciones.

Sellador de bolsas plásticas

Permite la confección de bolsas plásticas mediante sellado por calor, con cierres herméticos, del tamaño que se requiera. Es conveniente para bolsas que no se emplean en grandes cantidades o para tamaños no disponibles comercialmente.

Lámpara ultravioleta portable

Necesaria para la lectura manual de tubos MGIT.

Puede ser de cualquier tipo siempre que emita luz en el rango de UV. En dermatología se las denomina lámparas de Wood.

MGIT 960 ó 320

El equipo incubador y lector de cultivos realizados en MGIT tiene capacidad para incubar 960 tubos en 3 cajones o 320 tubos en 1 cajón. El modelo a elegir depende de la carga de trabajo y disponibilidad de espacio en el ACRB.

Se acopla a una UPS y una impresora. Como ya se ha explicado, es muy conveniente para un laboratorio que realiza PS adquirirlo con el software EpiCenter™ y el EpiCenter™ TB-eXiST, para cuya operación es necesaria conectarlo a una computadora y un escáner de código de barras.

Se deben adquirir portatubos (AST carriers según la denominación del fabricante) para armar las PS. La cantidad y tipo debe ser calculada en relación con la carga y el algoritmo de trabajo. Existen portatubos con capacidad para 2, 3, 4, 5 y 8 tubos.

El equipo requiere ser calibrado periódicamente para lo que es necesario adquirir los tubos calibradores necesarios.

GeneXpert

Se puede optar por equipos de 1 (versión normal o portable con batería recargable para operar durante 12 horas), 2, 4 o 16 módulos. Se acopla a un escáner de código de barras y a una computadora. Los módulos son reemplazables en forma individual, en el caso que fuera necesario.

El equipo requiere ser calibrado periódicamente para lo que es necesario adquirir cartuchos que integran el kit de calibración y el CD con el software necesario.

Equipamiento para LiPA

Pueden ser de distintas marcas comerciales,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

incluso las comercializadas por los fabricantes de los reactivos necesarios para la PS a drogas anti-tuberculosis descritas en esta Guía. Es posible emplear equipamiento básico con el que cuenta todo servicio de biología molecular. Estos laboratorios generalmente cuentan con equipos versátiles para varios protocolos de trabajo.

En general, es necesario verificar que el rango de temperaturas en el que trabaja cada equipo incluya el requerido por la técnica descrita y que pueda procesar/incubar microtubos o tiras en cantidad suficiente como para resolver la carga de trabajo del laboratorio en cada jornada de trabajo.

Los laboratorios de países con muy alta carga de TB MDR y que tienen concentradas las pruebas de LiPA en uno o pocos laboratorios con muy alta una carga de trabajo, pueden optar por automatizar la extracción ADN, la hibridación, lectura e interpretación de los resultados.

Se agregan a continuación algunas consideraciones sobre el equipo básico, que pueden ser útiles cuando es necesario adquirirlo sólo para las técnicas descritas en esta Guía.

Cabina para PCR

Son recomendables para preparar la mezcla de amplificación en laboratorios con alta carga de trabajo, para disminuir el riesgo de contaminación. Son cabinas pequeñas que facilitan la descontaminación e inactivación de ADN mediante sistemas de filtros HEPA por donde pasa el aire que es impulsado hacia el área de trabajo, y radiación, UV. Tienen superficies internas de acero inoxidable, epoxi, poliuretano y/o polipropileno que permiten la limpieza y desinfección.

Microcentrífuga

Dado que es utilizada para concentrar sedimentos de muestras y suspensiones bacilares, debe tener rotor con tapa para contención de aerosoles y que pueda ser trasladado a la CSB para su apertura.

Debe alcanzar 13000 g (no rpm) o más durante el centrifugado.

Baños Maria o calentador con bloques

Son necesarios dos equipos, ya sea baño Maria o calentador seco con bloques, uno dentro de ACRB y otro fuera, en el área dedicada a la amplificación de ácidos nucleicos. Deben operar en el rango de temperatura ambiente hasta $100^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ y permitir la colocación de microtubos flotantes o encajados, respectivamente.

Por otra parte, debe haber un equipo adicional en el área de hibridación donde se debe incubar, con agitación, las bandejas con canaletas conteniendo las tiras con sondas y el producto de la amplificación. Esto puede ser realizado en un Baño Maria con agitación, pero es más práctico y seguro hacerlo en seco, sobre cualquier plataforma/incubador con agitación horizontal rotatoria, cuya velocidad pueda ser graduada. Debe operar en el rango de temperatura ambiente- 55°C y, en este caso, es muy crítica la uniformidad y precisión de la temperatura que asegure el equipo.

Termociclador

Existen equipos simples que permiten guardar un número determinado de programas para distintos protocolos de amplificación, con un solo bloque para colocar microtubos. Y también existen equipos con complejidad creciente hasta los que permiten guardar un alto número de programas y trabajar con más de uno a la vez, con una graduación de temperatura (empleada habitualmente para estandarizar métodos aun en desarrollo), con varios tipos de bloques para colocar microtubos, en conexión con otros cicladores o una computadora, con PCR en tiempo real, etc. Los más simples son adecuados para implementar las pruebas descritas en esta Guía, el bloque de calentamiento debe poder albergar microtubos de PCR de 0,2 ml en cantidad adecuada para la carga de trabajo del laboratorio y trabajar en el rango de 0 a 100°C . Los parámetros críticos para asegurar procedimientos

eficientes son: precisión ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ o menos), alta velocidad de calentamiento/enfriamiento ($5^{\circ}\text{C}/\text{seg}$ o más) y alta uniformidad de temperatura en el bloque ($\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ entre distintos hoyos o menos).

Aspirador de líquidos

Existen equipos pequeños compuestos por una bomba de vacío, recipiente(s) recolector(es) para el líquido aspirado que aceptan distintos tipos de pipetas y adaptadores para puntas con las que es posible realizar la aspiración, con velocidad y volumen de aspirado graduable. Pero puede emplearse un equipo sencillamente ensamblado en el laboratorio, por ejemplo, con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío estándar.

MATERIAL DE VIDRIO, PLÁSTICO Y OTROS

Se recomienda revisar el Anexo III de la parte 2 de este Manual dedicada al Cultivo. Se considerarán aquí el material no descrito en ese Anexo y que es necesario o útil para el laboratorio que realiza PS.

En general, todo el material debe ser de material plástico desechable (y a la vez estéril cuando va a ser empleado para cualquier PS) o autoclavable. Mediante los controles de calidad internos se debe comprobar que el material que se emplee no genere falsos resultados, ya sea porque inhibe el desarrollo de *M. tuberculosis* o porque adsorbe los antibióticos sobre la superficie haciendo que disminuya su concentración efectiva.

Para extremar la bioseguridad, se debe verificar la resistencia de los materiales, y la hermeticidad y firmeza del cierre de las tapas.

Botellas McCartney

De vidrio resistente, capacidad de hasta 30 ml, con tapa de rosca de aluminio o baquelita que tengan discos de teflón u otro material para su cierre hermético. Conteniendo las perlas de vidrio, son útiles para la homogeneización de las suspensiones bacilares. Alternativamente se pueden emplear tubos con tapa de bakelita, de vidrio muy transparente y resistente.

Perlas de vidrio

De borosilicato, se venden por peso (generalmente 1 kg), su diámetro puede ser de 3 a 6 mm aproximadamente.

Cajas Petri

De vidrio o, preferentemente de plástico, desechables, de 100 mm de diámetro, divididas en cuadrantes, para el método de las proporciones con agar Middlebrook 7H10/7H11.

Desecador

De vidrio o plástico, con cierre hermético por vacío o con el empleo de grasa, para preservar los antibióticos. Son necesarios varios, para las distintas temperaturas a las que se preservan los reactivos, y con la capacidad adecuada para la rutina de trabajo.

Puntas para micropipetas

Deben ser adecuados para las micropipetas disponibles (consultar la compatibilidad según información normalmente provista por el fabricante) y el volumen que se requiere transferir,

Para operar con material (potencialmente) infeccioso y/o el empleado para pruebas moleculares son necesarias las puntas estériles, con protección para aerosoles. Esta protección puede disminuir la capacidad útil (el volumen que puede transferir).

Es preferible desechar las puntas empleadas. Sin embargo, existen puntas autoclavables que permiten su reutilización un limitado número de veces. En ese caso, y cuando es necesario, hay que reponer manualmente la barrera de protección para aerosoles (puede ser preparada con algodón) después de limpiar exhaustivamente y antes de esterilizar las puntas.

Para pruebas moleculares deben estar libres de enzimas que puedan cortar el material genético (ADNasas y ARNasas). El autoclavado destruye esas enzimas.

Microtubos

Deben elegirse según el volumen requerido (entre 0,2 y 2 ml). Pueden tener colores diferentes para codificar su contenido, pueden ser estériles o no. Deben ser seleccionados según la aplicación.

- Criotubos: resistentes al (ultra) congelado, con tapa con rosca externa (para evitar que el contenido contamine los guantes cuando son abiertos), con cierre hermético asegurado por o-ring dentro de la tapa, deben facilitar el rotulado permanente, los hay con códigos de barras para laboratorios que tienen implementado este sistema de codificación,
- Tubos para microcentrifuga: soportan 20.000 g, fondo cónico, con tapa a presión cuyo cierre hermético debe ser muy seguro (de otra forma se destapan durante la centrifugación),
- Tubos para PCR de pared ultrafina (para

asegurar cambios rápidos de temperatura en contacto con el bloque del termociclador) con tapas planas y cierre muy seguro (de otra forma se destapan durante el termociclador originando alto riesgo de contaminación cruzada).

Cajas y gradillas para microtubos

De propileno, pueden tener colores diferentes para codificar su contenido.

- Es conveniente comprar una cantidad suficiente de
- cajas (*racks*) de polipropileno para acomodar 96 puntas estériles done pueden ser autoclavadas, ordenadamente, para reciclarlas,
 - cajas con tapa transparente, que permiten el encaje seguro de microtubos en su interior, para su almacenamiento ordenado en refrigeración o (ultra)congelamiento, permitiendo la rápida identificación de los tubos que requieren ser retirados. Existen modelos con tapa cuadrículada que permiten rotular sobre ella el código correspondiente al tubo que se ubica en cada posición,
 - gradillas o sostenes para microtubos de cada uno de los tamaños que se emplee, apilables para permitir su guardado ordenado en el menor espacio posible

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MEDIOS

Precauciones generales

Esta tarea debe ser realizada fuera del ACRB para evitar exposición innecesaria a riesgo biológico del personal que la realiza.

Para asegurar la buena calidad, preservación y control de stock de drogas

- trabajar sólo con productos de fabricantes confiables, que documenten las características completas de cada una de ellos (riesgo que genera, fuente biológica o método de síntesis, apariencia física, solubilidad, pureza, condiciones de almacenamiento) y que provea certificado de análisis de cada lote, muchas veces accesible vía INTERNET,
- trabajar solo con antibióticos provistos para análisis y que certifiquen su potencia o los parámetros necesarios para calcularla; no emplear fármacos usados para la medicación porque contienen excipientes,
- aceptar sólo las drogas en los envases originales del fabricante, herméticamente cerrados (no fraccionados por algún proveedor),
- conservar todas las drogas en sus frascos originales diseñados para asegurar las mejores condiciones (hermeticidad del cierre, protección de la luz y/o refrigeración en caso necesario, etc),
- conservar los antibióticos, a la temperatura indicada por el fabricante, dentro de desecadores conteniendo algún material desecante como gel de sílice o cloruro de calcio, preferentemente con vacío,
- aguardar a que tome temperatura ambiente todo desecador que estuvo en refrigeración, antes de abrirlo, para evitar que el agua de condensación humedezca las drogas que se retiren de él,
- descartar inmediatamente cualquier reactivo que tenga alteradas sus características normales o que haya expirado,
- mantener una base de datos identificando para cada droga o reactivo el n° de cada lote recibido, ubicación en el almacén o (ultra) refrigerador, fechas de vencimiento, recepción, apertura y baja, así como el stock mínimo que el laboratorio debe mantener de cada uno según su carga de trabajo,
- rotular en forma prolija y durable todos reactivos y medios preparados en el laboratorio, con nombre, número de lote fecha de preparación, fecha de apertura y vencimiento,
- mantener un plan regular de limpieza y orden del almacén, armarios, refrigeradores y congeladores.

Es necesaria mucha precisión para preparar los medios y reactivos empleados en un laboratorio que realiza PS, en especial los que contienen antibióticos y los empleados para pruebas moleculares. Para asegurar la mayor precisión posible en el pesado y medición de pequeñas cantidades, emplear:

- balanza analítica o microbalanza bien calibrada,
- microtubos o papeles o contenedores de papel para pesar, desechables, lo más pequeños posibles en relación con la cantidad a pesar y livianos, de superficies lisas y no absorbentes, bien conservados para que mantengan muy limpios, libres de polvo,

- pipeta o micropipeta, según corresponda, que permita medir el volumen necesario de diluyente, pero que no sea excesivamente grande,
- pipetas de doble aforo,

Es recomendable que no se pesen cantidades de antibióticos menores a los 100 mg.

Se debe respetar minuciosamente la regla de cambiar la pipeta o punta de micropipeta después de hacer cada dilución o al cambiar de solución o solvente.

Considerando todas las precauciones que se deben tomar para asegurar la precisión, cuando la PS está descentralizada puede ser conveniente que el laboratorio de referencia se responsabilice de la compra, pesado y distribución de los antibióticos, junto con instructivos para hacer las correspondientes diluciones en los laboratorios de la red que preparan medios de cultivo con drogas.

Patrones turbidimétricos **Solución Mc Farland**

Materiales

- 1 pipeta de 10 ml
- 1 pipeta de 1 ml
- 1 propipeta
- 1 tubo de 15 ml con tapa a rosca (usar el mismo tipo de tubo que se utiliza para preparar las suspensiones bacilares madre, de manera que la comparación visual sea más precisa).

Reactivos

- solución acuosa de cloruro de bario (BaCl₂) 1 %
- solución acuosa de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1%.

Procedimiento

- Mezclar las soluciones dentro del tubo con tapa a rosca, con volúmenes diferentes según el número de estándar a preparar:

Mc Farland No. 1

solución acuosa de cloruro de bario (BaCl ₂) 1 %	0,1 ml
solución acuosa de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 1%	9,9 ml

Mc Farland No. 0,5

solución acuosa de cloruro de bario (BaCl ₂) 1 %	0,05 ml
solución acuosa de ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 1%	9,95 ml

- Conservar el tubo con su tapa herméticamente cerrada, entre 2 y 25°C.

Antes de usar, permitir que el tubo alcance temperatura ambiente y agitar con vortex.

Descartar si se detectan evidencias de evaporación, contaminación, decoloración o evaporación. Renovar, al menos, semestralmente.

BCG 1 mg/ml

Equipamiento

- CSB o equipo de flujo laminar
- propipeta

Materiales

- 1 ampolla o frasco de vacuna BCG liofilizada
- 1 pipeta de 1 ml estéril
- 1 pipeta de 10 ml
- agua destilada estéril
- 1 tubo de 15 ml con tapa a rosca (usar el mismo tipo de tubo que se utiliza para preparar las suspensiones bacilares madre, de manera que la comparación visual sea más precisa).

Procedimiento

- Verificar la cantidad de masa bacilar que contiene el vial de vacuna BCG según lo declarado por el fabricante en su rótulo,
- Dentro de una CSB o equipo de flujo laminar, reconstituir el contenido de ese vial con volumen suficiente de agua destilada estéril como para alcanzar la concentración de 1mg/ml,
- Transferir la suspensión al tubo con tapa a rosca,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Conservarlo con su tapa herméticamente cerrada, en refrigeración.

Antes de usar, agitar con vortex

Descartar ante cualquier evidencia de contaminación, grumos o evaporación

Renovar al menos anualmente.

Medios de cultivo con antibióticos e inhibidores selectivos

Principios

Solución madre

En algunos casos es necesario seleccionar cuidadosamente la fórmula del antibiótico que se adquiere, entre las disponibles en el mercado. Es necesario emplear:

- sulfato de dihidroestreptomicina y no sulfato de estreptomicina porque este último es, inicialmente, más activo que el primero y, luego, su actividad decae rápidamente al ser incorporado al LJ,
- DL-cicloserina y no a D ó L-cicloserina porque las dos últimas son mucho menos solubles.

Para evitar pesar el antibiótico o inhibidor selectivo cada vez que se prepara un lote de medio, es conveniente conservar congelada una solución concentrada (solución madre), excepto en los casos en los que la concentración o actividad de la droga no es estable en solución (R, cicloserina, etionamida). La solución madre debe ser lo suficientemente concentrada como para minimizar el riesgo de inactivación del antibiótico durante el congelamiento y, a la vez, asegurar la completa disolución de la droga. Normalmente una concentración de 10.000 µg/ml (10 mg/ml) o de 20.000 µg/ml (20 mg/ml) es adecuada.

La potencia es la proporción de antibiótico puro que contiene la droga adquirida, expresado en porcentaje, µg/mg o, lo que es lo mismo, en mg/g.

Puede variar de un fabricante a otro y de un lote a otro. La potencia puede ser declarada directamente por el fabricante o puede ser calculada a partir de los siguientes datos, también declarados por el fabricante: 1) pureza de la droga, 2) contenido de agua, y 3) proporción de antibiótico que contiene la molécula de la droga (fracción activa). La fracción activa es 100% si la molécula de la droga sólo contiene antibiótico. Pero es menor si el antibiótico es provisto en forma de sal, o si contiene agua o impurezas. Normalmente la I y R son vendidas como drogas anhidras y con pureza $\geq 99\%$. En este caso la potencia es prácticamente 100% o 100 µg/mg y no es necesario hacer ajustes.

Pero si son necesarios los ajustes con otras drogas, como los aminoglucósidos, la capreomicina y las FQN, pueden adquirirse en forma de sal y, a veces, con cierto contenido de agua y/o impurezas.

Una vez conocida la potencia, es posible calcular el peso y volumen de diluyente necesarios para preparar una solución madre con determinada concentración.

Ejemplos

		(Sequi)sulfato de dihidroestreptomicina	(Di)sulfato de amicacina	Hemihidrato de levofloxacinina
Información declarada por el fabricante	potencia (µg)	no declarada	786	no declarada
	fórmula	$C_{21}H_{41}N_7O_{12} \cdot 1.5H_2SO_4$	$C_{22}H_{48}N_5O_{13} \cdot 2H_2SO_4$	$C_{18}H_{20}FN_3O_4 \cdot 0.5H_2O$
	peso molecular (g/mol)	730.71	781.76	370.38
	pureza	98,10%	no declarado	98,00%
Cálculos realizados en el laboratorio	contenido de agua	no contiene		0.5H ₂ O
	peso molecular de la sal	$1,5[(2*1,0)+32,06+(4*16,0)] = 147,09$		'-----
	peso molecular del agua			$0,5*(2*1,0+16) = 9$
	peso molecular del antibiótico libre de sal y de agua	$730,71 - 147,09 = 583,62$		$370,38 - 9 = 361,38$
	Proporción de antibiótico en la droga adquirida	$583,62/730,71 = 0,7987 (79,87\%)$		$361,38/370,38 = 0,9570 (95,70\%)$
	Potencia (%)	$79,87*98,10/100 = 78,35$	78,6	$95,70*98,0/100 = 93,8$
	Potencia (µg/mg)	783	786	938

En estos ejemplos, la dihidro-S fue adquirida como sal (sulfato). Restando el peso molecular del sulfato que contiene la molécula, se obtuvo el peso molecular de la dihidro-S el que representa un 79,87% del peso total de la molécula. Y ésa sería la potencia si la droga fuera totalmente pura. Pero, el certificado de análisis del lote indica que la pureza es del 98,1%, por lo que se debe aplicar ese porcentaje sobre el 79,87%. Haciendo ese cálculo se llega a que el 78,35% del peso de la droga adquirida es dihidro-S pura o, lo que es lo mismo, cada miligramo de droga contiene 783,5 µg de antibiótico. La potencia es, entonces, 78,35% o 783,5 µg/mg.

En el caso de la Lfx, fue adquirida con una fórmula que contiene media molécula de agua. Restando el peso del agua, se puede calcular el peso del antibiótico puro que representa 95,7% del peso molecular total. Como, a su vez, la pureza del lote es del 98,0%, el 93,8% de la droga adquirida corresponde a Lfx. La potencia es 93,8% ó 938 µg/mg.

El fabricante declara la potencia de la A adquirida por lo que, en este caso, no es necesario calcularla.

Conocida la potencia, es posible calcular la cantidad de droga que debe ser pesada para preparar la solución madre, según el volumen de esta solución que se requiera. Suponiendo que se quiere preparar 10 ml de una solución madre con una concentración de 10 mg/ml, es necesario pesar 100 mg (100.000 µg) del antibiótico y disolverlo en 10 ml del diluyente. Se pesaría directamente 100 mg en el caso de contar con un antibiótico con pureza > 99%, libre de sal y de agua. En otros casos es necesario calcular cuánto hay que pesar de la droga adquirida para tener 100 mg (ó 100.000 µg) de antibiótico.

Continuando con los ejemplos anteriores, para el caso del sequisulfato de dihidro-S, se ha calculado que cada mg de droga adquirida contiene sólo 783,5 µg de antibiótico. Entonces aplicando la regla de las proporciones o regla de tres:

$$\begin{array}{l}
 783,5 \mu\text{g de antibiótico} \text{ ----- } 1 \text{ mg de droga adquirida} \\
 100.000 \mu\text{g de antibiótico} \text{ ----- } x = \frac{1*100.000}{783,5} = 127,63 \text{ mg de droga adquirida}
 \end{array}$$

Es decir, es necesario pesar 127,63 mg para tener 100 mg (ó 100.000 µg) de antibiótico, y disolverlos en 10 ml de su diluyente.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

La fórmula general que resume este razonamiento es

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volumen solución madre (ml)} * \text{concentración solución madre (}\mu\text{g/ml)}}{\text{potencia (}\mu\text{g/mg)}}$$

Aplicando la fórmula a los 3 ejemplos anteriores

	(Sequi)sulfato de dihidroestreptomina	(Di)sulfato de amicacina	Hemihidrato de levofloxacina
potencia (μ /mg)	783,5	786	938
Peso (mg)	$10 * 10.000 / 783,5 = 127,63$	$10 * 10.000 / 786 = 127,23$	$10 * 10.000 / 938 = 106,61$

Al pesar esas cantidades tan pequeñas se puede incrementar el error por la necesidad de agregar o retirar reiteradamente droga del recipiente ubicado dentro de una balanza analítica. Para evitar este tipo de error, es recomendable pesar una cantidad aproximada y luego calcular el volumen de diluyente a agregar.

Siguiendo el ejemplo, se quiere preparar aproximadamente 10 ml de una solución stock de 10.000 μ g/ml de dihidro-S que tiene una potencia de 78,35%. O sea que se debe agregar 127, 63 mg a 10 ml de diluyente. Al agregar con una espátula droga sobre el papel o recipiente colocado en la balanza, tratando de llegar a una cantidad cercana a los 100 mg, la balanza indica que lo que se ha puesto pesa 132 mg. Aplicando la regla de las proporciones:

$$\begin{array}{l} 127,63 \text{ mg de droga} \text{ ----- } 10 \text{ ml de diluyente} \\ 132 \text{ mg de droga} \text{ ----- } x = \frac{132 * 10}{127,63} = 10,34 \text{ ml} \end{array}$$

Es decir los 132 mg de droga pesados deben ser disueltos en 10,34 ml de diluyente para obtener una solución madre de 10.000 μ g/ml o 10 mg/ml

La fórmula general para ajustar el volumen de diluyente según la cantidad de droga pesada es

$$\text{volumen diluyente (ml)} = \frac{\text{peso de la droga (mg)} * \text{potencia (}\mu\text{g/mg)}}{\text{concentración solución madre (}\mu\text{g/ml)}}$$

Suponiendo que se ha pesado 132, 105 y 125 mg de cada una de las 3 drogas de los ejemplos considerados, los siguientes son los cálculos correspondientes

	(Sequi)sulfato de dihidroestreptomina	(Di)sulfato de amicacina	Hemihidrato de levofloxacina
potencia (μ /mg)	783,5	786	938
cantidad pesada (mg)	132	105	125
volumen diluyente (ml)	$132 * 783,5 / 10.000 = 10,3$	$105 * 786 / 10.000 = 8,2$	$125 * 938 / 10.000 = 11,7$

Es decir, es necesario agregar 10,3, 8,2 y 11,7 ml de diluyente a cada una de las drogas pesadas para obtener, en todos los casos, una solución madre de 10.000 μ g/ml o 10 mg/ml.

Diluyentes

La disolución de cada antibiótico comienza con el solvente recomendado, según la solubilidad que tenga. Puede ser más soluble en agua o en una base (NaOH) o un alcohol (como etanol) en un solvente orgánico (DMSO o dimetil-formamida).

Si no es agua, el primer diluyente es empleado sólo para realizar la disolución completa inicial, en la mínima cantidad posible, y luego se emplea agua para diluciones posteriores. Así, el residuo del diluyente inicial es insignificante. Para ciertas drogas que son prácticamente insolubles en agua, es necesario usar un solvente orgánico para continuar diluyendo la solución madre. En ese caso es importante cuidar que la dilución final sea agregada en baja proporción en relación con el medio de cultivo ($\leq 1,5\%$) dado que el solvente puede tener de por sí efecto inhibitorio y/o alterar la permeabilidad de la pared del bacilo, y por lo tanto su sensibilidad al antibiótico. También puede ser necesario incorporar un control sin antibiótico en la PS en el que se agregue el diluyente en igual proporción que en el medio con droga.

Conservación

Las soluciones madres de los antibióticos no requieren ser esterilizadas mediante filtración. Si, excepcionalmente, se registran episodios reiterados de contaminación con un mismo antibiótico, se debe descartar la solución madre correspondiente.

No es conveniente preservar las soluciones madres preparadas con solventes orgánicos o con algún alcohol porque el disolvente puede evaporar y, por lo tanto, la concentración del antibiótico se incrementa y es incierta. Solo podrá optarse por conservarlas cuando se haya demostrado consistentemente y documentado las mejores condiciones para hacerlo (envase con cierre muy hermético, temperatura, tiempo).

Las soluciones acuosas, en cambio, pueden ser congeladas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos, en alícuotas. En

términos generales tienen una duración de un año, si no se ha interrumpido el congelamiento. Independientemente del tiempo transcurrido, deben ser descartadas si se detecta deterioro mediante los controles de calidad que deben ser realizados con cepas de referencia y con cada lote de medio que se prepara.

Si por cualquier razón la solución madre no puede ser conservada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ó menos, en forma confiable, debe ser descartada después de utilizada para preparar un lote de medio.

El volumen de cada alícuota debe ser levemente superior al necesario para preparar un lote de medio empleado en la rutina del laboratorio. Cada alícuota debe ser descongelada el día en que se prepara un lote de medio, y el remanente debe ser descartado.

Concentraciones críticas

Luego de revisar la evidencia publicada hasta el momento de redacción de estas guías, la OMS recomendó el empleo de las siguientes concentraciones de los fármacos antituberculosis en los medios de cultivo:

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Concentraciones críticas de las drogas recomendadas por OMS
para la prueba de sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis*
WHO /CDS/TB/2018.5

Grupo	Droga	Concentración (µg/ml)			
		Löwenstein-Jensen	Middlebrook 7H10	Middlebrook 7H11	MGIT 960/320
1a línea , orales	Isoniazida	0,2	0,2	0,2	0,1
	Rifampicina	40,0	1,0	1,0	1,0
	Etambutol	2,0	5,0	7,5	5,0
	Pirazinamida	-	-	-	100,0
Inyectables	Estreptomicina	4,0	2,0	2,0	1,0
	Kanamicina	30,0	4,0	-	2,5
	Amikacina	30,0	2,0	-	1,0
	Capreomicina	40,0	4,0	-	2,5
Fluoroquinolonas	Levofloxacina	2,0	1,0	-	1,0
	Moxifloxacina ^a	1,0	0,5	0,5	0,25
	Gatifloxacina	0,5	-	-	0,25
Otras de segunda línea	Etionamida	40,0	5,0	10,0	5,0
	Protionamida	40,0	-	-	2,5
	Linezolid	-	1,0	1,0	1,0
	Clofazimina	-	-	-	1,0
	Bedaquilina	-	-	0,25	1,0
	Delamanid	-	-	0,016	0,06

^a Para aislamientos con mutaciones que determinan una CIM de Mxf moderadamente elevada por sobre la concentración crítica, se puede considerar elevar la dosis diaria de Mxf en el tratamiento. En ese caso se recomienda ensayar la Mfx a 1 µg/ml en MGIT o 2mg/l in 7H10.

Para ensayar drogas de 2da línea OMS recomienda el método indirecto dado que el directo no ha sido suficientemente validado.

No se ha consignado la concentración para ciertas drogas y medios para los no existe evidencia suficiente como para hacer una recomendación o para las que los resultados no son suficientemente precisos.

Se ha propuesto que la isoniacida podría ser mantenida para el tratamiento de casos afectados por cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a la

concentración que presenta el cuadro anterior, pero sensible a una concentración mayor. Sin embargo, la evidencia era aún insuficiente en el momento de redacción de estas guías para recomendar la concentración más alta que mejor permite guiar esa decisión clínica.

Con E, los resultados no son totalmente equivalentes usando distintos medios, pero no hay suficiente evidencia como para recomendar cambios en la concentración de ninguno de ellos.

Hasta el momento de redacción de estas guías,

la Lfx, Mxf, etionamida, protionamida, linezolid, clofazimina, bedaquilina y delamanid no estaban aún incluidas en el programa de evaluación externa de la calidad conducido por la Red de LSN. La evidencia que sustentó la selección de las concentraciones de estas drogas en los medios de cultivo había sido producida mayormente en condiciones de investigación y en laboratorios de referencia. Las indicaciones para realizar la PS podrían variar cuando se incremente la experiencia con ellas.

En general, las concentraciones que se recomiendan son sometidas a revisión periódica a la luz de la evidencia que se produzca. Los laboratorios de referencia deben mantener actualizada esta información.

Medios de cultivo

Los medios de cultivo sin y con drogas empleados en cada PS deben pertenecer al mismo lote (es decir deben haber sido preparados al mismo tiempo) Esto asegura que las diferencias en el desarrollo que puedan observarse entre el control y el medio con droga(s) no sea causado por distinta calidad del medio.

Suponiendo que se desean preparar lotes del siguiente tipo:

- Sin droga (control), I y R para investigar casos que resultaron sensibles a R , y eventualmente también a I, por pruebas rápidas
- Sin droga (control) I, R, S, E, FQN e inyectables empleados por el PNT del país para investigar casos con resistencia a R y /o I detectado por pruebas rápidas antecedentes de resistencia a R y/o I exposición a TB RR o MDR (contactos) intolerancia a las drogas de primera línea

El volumen de medio de cada lote debe ser calculado en relación con la carga de trabajo y la capacidad para preparar medio, considerando que es conveniente que sean utilizadas dentro del mes de preparado.

Ejemplo:

Carga mensual promedio de trabajo (incluyendo repeticiones):			
PS a I y R		29	
PS a I, R, S, E, Lvx, Mxf ,K,A,C		2	
Método empleado	de las proporciones en LJ		
Volumen de LJ dispensado por tubo		7 ml	
Volumen de LJ necesario			
		Redondeo	Volumen
Lote A (I y R)			
Sin droga (control)	$7 \text{ ml} * 29 * 6 = 1218 \text{ ml}$	1200 ml	1200
Con cada droga	$7 \text{ ml} * 29 * 2 = 406 \text{ ml}$	400 ml	+ (400*2)
			2000 ml
Lote B (I, R, S, E, Lvx, Mxf ,K,A,C)			
Sin droga (control)	$7 \text{ ml} * 2 * 6 = 84 \text{ ml}$	100 ml	100
Con cada droga	$7 \text{ ml} * 2 * 2 = 28 \text{ ml}$	30 ml	+(30*9)
			370 ml

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Se han multiplicado el volumen de cada tubo, por el número de PS/mes, por el número de tubos empleados en cada PS. Luego, para facilitar los cálculos y la preparación, se han redondeado las cifras resultantes. Por último, se ha sumado el volumen total de medio que es necesario preparar considerando la cantidad de drogas que integran el lote.

Así para el Lote A se requieren 400 ml de LJ con cada una de las drogas (I y R) y 1200 ml de medio sin droga para los controles, lo que hace un total de 2000 ml.

Para el Lote B, se requiere un total de 370 ml (100 ml para el control y 30 ml para cada una de las drogas). Estos 370 ml pueden ser separados de un lote de LJ que se prepare en el día, dejando el remante para ser envasado como LJ común para cultivos o repiques.

De la misma forma se pueden hacer los cálculos para preparar las placas de medio Middlebrook reemplazando tubos por cuadrantes y considerando el volumen que se dispensa en cada cuadrante.

En el caso de laboratorios con muy alta carga de trabajo, puede suceder que no se tenga capacidad suficiente (recursos humanos, coagulador etc.) para preparar en un día de trabajo el volumen total de medio que precisa mensualmente. En ese caso será necesario preparar lotes más pequeños y repetir el procedimiento más de una vez por mes.

Para lograr la concentración crítica en el medio, es posible preparar soluciones madre con diferentes concentraciones, según convenga, y agregar al medio una cantidad de solución similar o igual para todas las drogas. O uniformar la concentración de las soluciones madres, por ejemplo, en 10.000 µg/ml, y variar el volumen de solución que se agrega al medio. Por practicidad, en esta Guía se adoptó esta última alternativa, excepto con el PNB cuya concentración es relativamente alta.

Se puede agregar una cantidad de solución de antibiótico o inhibidor que no supere el 1%

del volumen del medio y, para homogeneizar tan pequeño volumen agregado, debe mezclarse cuidadosa y exhaustivamente. Como alternativa, se puede agregar un volumen de solución de antibiótico que supere el 1% del volumen del medio, con lo cual se facilita la homogeneización, pero en este caso es necesario hacer correcciones para alcanzar la concentración crítica, considerando el total de volumen de medio más el de la solución de antibiótico que se agrega. Por practicidad, en este Manual se adoptó la primera alternativa, excepto con el PNB.

Por bioseguridad, se deben emplear tubos de vidrio resistentes para envasar el LJ y es preferible emplear tubos anchos (ej. 20 x 150 mm) porque esto favorece una mejor distribución del inóculo y el mayor crecimiento de las colonias lo que, a su vez, facilita su rápida identificación y conteo. Si se utilizan tubos de otro tipo de material sintético, es necesario verificar que el mismo no inhiba el desarrollo y que permita visualizar perfectamente las colonias desarrolladas. En los laboratorios de nivel de seguridad 3 se debe evitar el empleo de algodón para evitar obturar los filtros de las CSB y sistemas de manejo de aire, por eso se indica el empleo de tubos con tapa a rosca.

Los siguientes son puntos críticos

- la homogeneización del medio luego de agregado el antibiótico para asegurar que todos los tubos o placas preparados contengan la misma concentración,
- para el agar Middlebrook, la temperatura del medio en el momento de agregado de las drogas,
- en el caso del LJ, el tiempo (40-45 minutos) y la temperatura (80°C) de coagulación,
- la preservación del medio en refrigeración, protegido de la desecación y de la luz.

Solución madre de los antibióticos e inhibidores selectivos

Pesado de las drogas y cálculos

Equipos

- Balanza analítica o microbalanza calibrada
- Mechero (deseable)

Materiales

- Marcadores para vidrio punta fina,
- Pincel,
- Alcohol 70%,
- Placa de Petri estéril,
- Espátula,
- Marcador de vidrio

Por cada solución de antibiótico a preparar:

- 1 tubo de polipropileno de 15 ml, transparente, boca ancha, con tapa, estéril, rotulado con el nombre del antibiótico o inhibidor
- Para el PNB, 1 papel o recipiente plástico para pesar.

Reactivos

- Cada una de las drogas que integran el lote de medio, con potencia conocida
Ver el método arriba descripto para calcular la potencia en el caso en que no esté declarada por el fabricante.

Procedimiento

- Encender la balanza 5 minutos antes de su empleo, comprobar que esté equilibrada antes de usar,
- Para preservar la esterilidad, es conveniente encender y ubicar un mechero a aproximadamente 20 cm de la balanza,
- Abrir la puerta de la balanza y limpiar con un pincel el platillo y superficies interiores,
- Colocar el tubo, suavemente, sobre el centro del platillo,
- Cerrar la puerta,
- Tarar el tubo (la balanza debe marcar 0,0000),
- Abrir la puerta, retirar el tubo con suavidad,
- Introducir la espátula en alcohol, flamearla en el mechero, dejar enfriar (puede ser apoyada sobre una placa de Petri estéril ubicada cerca del mechero mientras no está en uso).

Realizar los dos siguientes pasos cerca del mechero:

- Abrir el frasco , con la espátula tratar de tomar de una vez una cantidad ligeramente superior a los 100 mg de la droga, cerrar el frasco,
- Abrir la tapa del tubo y descargar dentro lo recogido con la espátula, cerrar la tapa,
- Abrir la puerta de la balanza, colocar cuidadosamente el tubo en el centro del platillo y cerrar la puerta,
- Esperar que la balanza se estabilice,
- Si el peso es menor a los 100 mg, repetir los 7 pasos anteriores para agregar más antibiótico dentro del tubo, e igualar o superar ligeramente esa cantidad,
- Retirar el tubo de la balanza,
- Registrar en la pared del tubo y en la planilla de trabajo el peso exacto de antibiótico.

Repetir el procedimiento con todos los antibióticos y/o inhibidores selectivos que integran el lote de medio (excepto el PNB para el que se describe el procedimiento más adelante).

- Para cada droga pesada, calcular el volumen total de diluyente a agregar con la siguiente fórmula:

$$\text{volumen diluyente (ml)} = \frac{\text{peso de la droga (mg)} * \text{potencia } (\mu\text{g/mg})}{\text{concentración solución madre } (\mu\text{g/ml})}$$

- Registrar el volumen calculado en la planilla de trabajo y en la pared del frasco que contiene cada antibiótico o inhibidor selectivo

Para el PNB:

- Repitiendo los procedimientos arriba descriptos, pesar exactamente 2,5 g de la droga sobre un papel o recipiente

Disolución de las drogas y conservación

Equipos

- Cabina de esterilidad (preferible) o mechero,
- Agitador tipo vortex,
- (Ultra) congelador -20°C ó menos,
- Propipeta o pipeteador automático

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Materiales

- Pipetas de 1 ó 2 ml estériles
- Pipetas de 10 ml estériles
- Criotubos, con tapa a rosca, de 2 a 5 ml para las soluciones madre que puedan ser congeladas por largo plazo
elegir el tubo según el volumen de cada alícuota que convenga preservar, considerando el volumen de medio con cada droga que se prepara en la rutina, según la carga de trabajo

Para el PNB:

- un erlenmeyer de vidrio de 100 ml estéril, graduado
- una pipeta de 5 ml

Reactivos

- tubos de polipropileno transparentes conteniendo cada droga pesada, rotulada con su nombre, peso, y con el volumen de diluyente necesario para preparar la solución madre,
- agua destilada estéril,
- diluyentes indicados para las drogas que se requiera diluir, según se detalla en la tabla que sigue,

Para el PNB:

- HCl 1N
- solución de fenoltaleína

Drogas y diluyentes iniciales

	Droga	Sal ^a	Diluyente
1a línea orales	Isoniacida		Agua destilada estéril
	Rifampicina ^b		Dimetilsulfoxido o Dimetilformamida
	Etambutol	clohidrato	Agua destilada estéril
Inyectables	Dihidroestreptomina ^c	sulfato	Agua destilada estéril
	Kanamicina	sulfato	Agua destilada estéril
	Amicacina	base o sulfato	Agua destilada estéril
	Capreomicina		Agua destilada estéril
Fluoroquinolonas	Ofloxacina		Agua destilada estéril NaOH 4% esteril
	Levofloxacina		Agua destilada estéril NaOH 4% esteril
	Moxifloxacina ^d	clohidrato	Agua destilada estéril NaOH 4% esteril
	Gatifloxacina		Agua destilada estéril NaOH 4% esteril
otras	Etionamida ^b		Dimetilsulfóxido ó Etilenglicol
	D L Cicloserina ^e		Agua destilada estéril
	PAS		Agua destilada estéril
Inhibidores selectivos para identificación	Hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH)		Agua destilada estéril
	Ácido p-nitrobenzoico (PNB)		Agua destilada estéril NaOH 4% esteril HCl 1 N fenoltaleína 0,1% en etanol (como indicador)

^a Forma generalmente provista por los fabricantes, pueden ser fórmulas anhidras ó con distinto contenido de H₂O

^b Disolver en el momento uso, no congelar la solución stock

^c Emplear sulfato de dihidroestreptomina y no sulfato de estreptomina

^d Puede no ser necesario el NaOH

^e Emplear DL-cicloserina.

Procedimiento

Trabajar dentro de una cabina de esterilidad (preferible) o al lado del mechero cuidando estrictamente la asepsia.

Antibióticos solubles en dimetilsulfóxido
R, etionamida

- Con pipeta de 2 ml agregar dimetilsulfóxido dentro del tubo conteniendo cada droga, agitando hasta lograr la completa disolución, registrar el volumen agregado en la planilla de trabajo.
- Con pipeta de 10 ml adicionar agua destilada estéril en cantidad suficiente para completar el volumen de diluyente total calculado (para alcanzar una concentración de 10.000 µg/ml con la cantidad de droga pesada); registrar el volumen agregado en la planilla de trabajo.
- Agitar hasta completa homogeneización.
- Linezolid, clofazimina, bedaquilina, delamanid
- Con pipeta de 10 ml agregar dimetilsulfóxido hasta completar el volumen de diluyente total calculado (para alcanzar una concentración de 10.000 µg/ml con la cantidad de droga pesada) registrar el volumen agregado en la planilla de trabajo
- Agitar hasta completa homogeneización

Utilizar las soluciones madre disueltas en dimetilsulfóxido en el día de preparación y descartar el remanente, a menos que se haya demostrado y documentado rigurosa y consistentemente la estabilidad de la solución madre congelada en condiciones determinadas (criotubo con cierre muy hermético, temperatura, tiempo máximo).

Antibióticos e inhibidores solubles a pH básico (FQN, PNB)

FQN:

- Con pipeta de 10 ml transferir 5 ml de agua destilada estéril dentro del tubo conteniendo

cada droga, registrar el volumen agregado en la planilla de trabajo.

Mfx y gatifloxacin pueden quedar disueltas sólo con el agua, sin necesidad del agregado de NaOH. Si es así, omitir el siguiente paso

- Con pipeta de 2 ml, agregar gota a gota NaOH 4%, agitando, hasta comprobar la completa disolución del antibiótico, registrar el volumen agregado en la planilla de trabajo,
- Con pipeta de 10 ml adicionar agua destilada estéril en cantidad suficiente para completar el volumen de diluyente total calculado (para alcanzar una concentración de 10.000 µg/ml con la cantidad de droga pesada); registrar el volumen agregado en la planilla de trabajo,
- Alicuotar la solución madre en criotubos, transfiriendo en cada uno el volumen conveniente de solución madre, según el volumen de medio que se prepare habitualmente en el laboratorio,
- Asignar un número de lote y rotular cada criotubo con el nombre del antibiótico y el número de lote,
- Guardar los criotubos a -20°C.ó preferentemente a - 70°C hasta 12 meses. Si se va a preparar medio en el mismo día, reservar una alícuota sin congelar para ese fin,
- Registrar en la planilla de trabajo el número de lote, el volumen que contiene cada criotubo , el número de alícuotas conservadas y fecha de vencimiento.
(ver modelo de registro al final de este capítulo).

PNB:

- Transferir los 2,5 g pesados al Erlenmeyer,
- Con pipeta de 10 ml agregar 15 ml de NaOH 4%. Si fuera necesario, agregar más NaOH hasta comprobar la completa disolución,
- Agregar agua destilada en cantidad suficiente para completar los 80 ml,

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Con pipeta de 1 ml, agregar 2 gotas de la solución de fenoltaleína,
- Con pipeta de 5 ml, agregar, gota a gota, HCl 1N hasta visualizar el viraje de color de la fenoltaleína (se requieren aproximadamente 3 ml),
- Agregar nuevamente agua destilada hasta completar un volumen final de 100 ml,
- Alicuotar la solución madre en criotubos, transfiriendo en cada uno el volumen conveniente la solución madre,
- Asignar un número de lote y rotular cada criotubo con el nombre del antibiótico y el número de lote,
- Guardar los criotubos a -20°C.ó preferentemente a - 70°C hasta 12 meses. Si se va a preparar medio en el mismo día, reservar una alícuota sin congelar para ese fin,
- Registrar en la planilla de trabajo el número de lote, el volumen que contiene cada criotubo, el número de alícuotas conservadas y fecha de vencimiento.
(ver modelo de registro al final de este capítulo).

Antibióticos e inhibidores solubles en agua (I, E, inyectables, cicloserina, PAS, TCH)

- Con pipeta de 10 ml adicionar agua destilada estéril en cantidad suficiente para completar el volumen de diluyente total calculado (para alcanzar una concentración de 10.000 µg/ml con la cantidad de droga pesada); registrar el volumen agregado en la planilla de trabajo,
- Alicuotar la solución madre en criotubos, transfiriendo en cada uno el volumen conveniente la solución madre, según el volumen de medio que prepare habitualmente el laboratorio,
- Asignar un número de lote y rotular cada criotubo con el nombre del antibiótico y el número de lote,

- Guardar los criotubos a -20°C.ó preferentemente a - 70°C hasta 12 meses. Si se va a preparar medio para la PS en el mismo día, reservar una alícuota sin congelar para ese fin.
- Registrar en la planilla de trabajo el número de lote, el volumen que contiene cada criotubo , el número de alícuotas conservadas y fecha de vencimiento.
(ver modelo de registro al final de este capítulo).

Si no se cuenta con ultra-congelador que mantenga la temperatura en forma confiable, en todos los casos, preparar la solución madre en el momento de su uso y descartar todo el remanente.

Lôwenstein Jensen con antibióticos o inhibidores selectivos

Equipamiento

- Cabina de esterilidad (preferible) o meche,
- Agitador tipo vortex,
- Propipeta o pipeteador automático,
- Coagulador.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Pipetero para descarte de pipetas,
- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar la cabina o superficies de la mesada de trabajo,
- Marcadores para vidrio con punta fina,
- Pipetas de 1 ml o micropipeta para dispensar 1 ml con punta estéril,
1 pipeta o punta por cada dilución 1:10 a realizar, ver el siguiente cuadro
- Pipetas de 2 ml estériles,
1 por cada antibiótico que integra el lote de medio
- Tubos transparentes de 15 ml con 9,0 ml de agua destilada estéril exactamente medidos,
1 por cada dilución 1:10 a realizar, ver el siguiente cuadro
rotulados con el nombre del antibiótico que corresponda, y la dilución de la solución madre que van a contener (1:10 ó 1:100).; agregar “final” a la última dilución necesaria

- Frascos o erlenmeyers graduados, de vidrio o polipropileno, con tapa, estériles, rotulados con el nombre de cada antibiótico, Cantidad: igual al número de drogas que integran el lote
Volumen: al menos 2 veces mayor al volumen de medio a preparar con cada droga, para poder homogeneizarlo
- Tubos de ensayo de 15 ml, anchos (ej 20x150mm), con tapa a rosca, estériles, en cantidad suficiente para envasar el volumen total del lote de medio a preparar
- Bolsas de polietileno o cajas plásticas limpias y desinfectadas, con tapa hermética, y capacidad suficiente para preservar el lote medio.
- Frasco o erlenmeyer estéril, con LJ preparado en el día, filtrado y sin coagular, volumen necesario para preparar el lote completo de medios sin y con drogas.
Ver arriba, en este Anexo, el método para calcular el volumen necesario
Ver en el Anexo IV de la parte 2 de este Manual, dedicada al cultivo, el método de preparación del medio LJ.

Procedimiento

Trabajar en cabina de esterilidad (preferentemente) o con mechero, con superficies de trabajo desinfectadas con alcohol 70°, cuidando muy estrictamente las condiciones de asepsia.

Reactivos y medio de cultivo

- Solución madre de cada antibiótico que integra el lote de medio a preparar,
Si se emplea una alícuota congelada, retirar del frío con anticipación, para que tome temperatura ambiente antes de ser empleada

Diluciones de las soluciones madre:

- Realizar las diluciones de las soluciones madre de los antibióticos e inhibidores que integran el lote de medio, en el mismo día en que se prepara, según se indica a continuación:

Dilución y agregado de la solución de antibióticos al medio de Lowenstein Jensen

	Droga	Concentración solución madre	Diluciones a realizar de la solución madre	Concentración de la última dilución	Volumen a agregar de la última dilución por cada 100 ml de LJ	Concentración final del antibiótico en el LJ
		µg/ml		µg/ml		ml
1a línea orales	Isoniacida	10.000	dos seriadas 1:10	100	0,2	0,2
	Rifampicina	10.000	ninguna		0,4	40,0
	Etambutol	10.000	una 1:10	1.000	0,2	2,0
Inyectables	Dihidro estreptomina	10.000	una 1:10	1.000	0,4	4,0
	Kanamicina	10.000	ninguna		0,3	30,0
	Amicacina	10.000	ninguna		0,3	30,0
	Capreomicina	10.000	ninguna		0,4	40,0
Fluoro quinolonas	Levofloxacina	10.000	una 1:10	1.000	0,2	2,0
	Moxifloxacina	10.000	una 1:10	1.000	0,1	1,0
	Gatifloxacina	10000	dos seriadas 1:10	100	0,5	0,5
Otras de segunda línea	Etionamida Protionamida	10.000	ninguna		0,4	40,0
Antibióticos e inhibidores selectivos empleados para identificación	D L Cicloserina	10.000	ninguna		0,3	30,0
	PAS	10.000	dos seriadas 1:10	100	1,0	1,0
	Hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico (TCH)	10.000	una 1:10	1.000	0,2	2,0
	Ácido p-nitrobenzoico (PNB)	25.000	ninguna		2,0	500,0

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Fraccionamiento del LJ:

- Homogeneizar el LJ, rotando manualmente el frasco o erlenmeyer que lo contiene,
- Fraccionar el medio en cada frasco o erlenmeyer graduado, rotulado con el nombre de cada droga que integra el lote, midiendo con mucha exactitud el volumen de medio necesario. Cerrar cada frasco o erlenmeyer inmediatamente después,
- Mantener el remanente del medio en su contenedor para ser envasado como LJ sin droga.

Agregado de antibiótico

- Tomar el tubo con la solución madre o la dilución “final”, según corresponda, del primer antibiótico. Agitar en vortex,
- Seleccionar el frasco que contiene LJ rotulado con el nombre de ese antibiótico,
- Con pipeta o micropipeta, transferir el volumen necesario de la solución de antibiótico dentro del frasco con LJ, cerrar el frasco,
- Homogeneizar completamente, rotando manualmente y mezclando cuidadosamente el medio dentro de su envase,
- Repetir los 4 pasos anteriores con todos los antibióticos que integran el lote,
- Descartar el remanente todas las soluciones madre y sus diluciones utilizadas.

Distribución y coagulación del medio

- Tomar el frasco de LJ con el primero de los antibióticos que integran el lote y homogeneizarlo nuevamente antes de envasar,
- Seguir las instrucciones que se presentan en el Anexo IV de la parte 2 de esta Guía para distribuir el medio en los tubos de ensayo y coagular. Cuidar que la temperatura no exceda los 80°C y el tiempo de coagulación no sea superior a los 40-45 minutos,
- Dejar enfriar a temperatura ambiente,
- Rotular cada tubo con el nombre del antibiótico que contiene (o con un símbolo o color que identifique sistemáticamente cada antibiótico

que se ensaya en el laboratorio) y el número de lote,

Repetir el proceso con el medio que contiene cada uno de los antibióticos que integra el lote y, finalmente, con el medio sin droga.

Separar los tubos de LJ sin droga necesario para la realización de las PS con los antibióticos que integran el lote, para que sea utilizado exclusivamente para la PS y no para otros fines.

Conservar todo el lote a 4°C, por un tiempo máximo de 1 mes, dentro de una bolsa de polietileno o caja plástica con tapa, rotulada con el nombre del antibiótico o droga, número de lote y fecha de vencimiento.

Proteger de la luz. Descartar ante cualquier evidencia de deshidratación o contaminación.

Disponer la realización del control de calidad del lote de medio preparado con cepas de referencia (ver el capítulo de Control de calidad interno de esta Guía).

Löwenstein Jensen con I y R para la prueba de nitrato reductasa

Equipamiento

- Cabina de esterilidad (preferible) o mechero,
- Agitador tipo vortex,
- Propipetas o pipeteador automático,
- Coagulador.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Pipetero para descarte de pipetas,
- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar la cabina o superficies de trabajo,
- Marcadores para vidrio con punta fina,
- 4 Pipetas de 1 ml o micropipeta para dispensar 1 ml con punta estéril,
- 3 pipetas de 2 ml estériles,

- 2 tubos transparentes de 15 ml con 9,0 ml de agua destilada estéril exactamente medidos, rotulados con I y la diluciones de la solución madre de I que van a contener (1:10 y 1:100 “final”)
- Tres frascos o erlenmeyers graduados, de vidrio o polipropileno, con tapa, estériles
Volumen: al menos 2 veces mayor al volumen de medio que deben contener, para poder homogeneizarlo,
Rotular uno con el nombre “control”, otro con “I” y otro con “R”
- Tubos de ensayo de 15 ml, con tapa a rosca, estériles
en cantidad suficiente para envasar el volumen total del lote de medio a preparar,
- Bolsas de polietileno o cajas plásticas limpias y desinfectadas, con tapa hermética, y capacidad suficiente para preservar el lote de medio.

Reactivos y medio de cultivo

- Solución madre de I 10.000 µg/ml,
 - Solución madre de R 10.000 µg/ml,
Ver forma de preparar arriba en este Anexo, bajo el título Solución madre de los antibióticos e inhibidores selectivos
- Si se emplea una alícuota congelada, retirar del frío con anticipación, para que tome temperatura ambiente antes de ser empleada
- Solución stock de nitrato de potasio (KNO₃) 200 g/l
diluir 1 g KNO₃ por cada 5 ml de agua destilada estéril,
 - Frasco o erlenmeyer estéril, con LJ preparado en el día, filtrado y sin coagular
Separar el volumen necesario según la carga de trabajo,
Ver ejemplo de cálculo al final de este ítem
Ver en el Anexo IV de la parte 2 de este Manual, dedicada al Cultivo, el método de preparación del medio LJ.

Procedimiento

Trabajar en cabina de esterilidad (preferentemente)

o con mechero, con superficies de trabajo desinfectadas, cuidando muy estrictamente las condiciones de asepsia.

Diluciones de la solución madre de isoniacida 10.000 µg/ml

- Agitar en vortex la solución madre,
- Ubicarla en una gradilla y a continuación ubicar los dos tubos conteniendo 9 ml de agua rotulados 1:10 y 1:100 “final”,
- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con pipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Agitar en vortex el tubo conteniendo la dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml y transferirlo al segundo tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:100 “final”. Descartar la pipeta o punta,
- Agitar con vortex la dilución final.

Agregado de nitrato de potasio

- Añadir en el frasco conteniendo el LJ sin coagular, 0,5 ml de la solución stock de nitrato de potasio por cada 100 ml del medio,
- Homogeneizar el LJ, rotando manualmente el frasco o erlenmeyer que lo contiene,
- Fraccionar el medio en tres frascos o erlenmeyers graduados, rotulados “control”, “I” y “R” midiendo con exactitud el volumen de medio transferido a cada uno. El frasco “control” deberá contener el triple de volumen que los otros dos. Cerrar cada frasco o erlenmeyer inmediatamente después de utilizar.

Agregado de antibiótico

- Agitar con vortex la dilución final de la solución de “I”,
- Agregar con pipeta 0,2 ml de esta solución por cada 100 ml de LJ con nitrato de potasio contenidos en el frasco rotulado “I”. Cerrar el frasco inmediatamente después de emplear,
- Agitar con vortex la solución madre de “R”,
- Agregar con pipeta 0,4 ml de la misma por cada 100 ml contenidos en el frasco “R”. Cerrar el

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

- frasco inmediatamente después de emplear,
- Homogeneizar ambos frascos completamente, rotando manualmente y mezclando cuidadosamente el medio dentro de su envase,
- Descartar el remanente de las soluciones madre de antibióticos y sus diluciones que se han empleado.

Distribución y coagulación del medio

- Tomar cada frasco de LJ que integra el lote y homogeneizarlo nuevamente antes de envasar,
- Seguir las instrucciones que se presentan en el Anexo IV de la parte 2 de este Manual, dedicada al Cultivo, para distribuir el medio en los tubos de ensayo y coagular. Cuidar que la temperatura no exceda los 80°C y el tiempo de coagulación no sea superior a los 40-45 minutos,
- Dejar enfriar a temperatura ambiente,
- Rotular cada tubo con el nombre del medio

(o con un símbolo o color que identifique sistemáticamente al lote de LJ con nitrato de potasio control, con I y con R) y el número de lote correspondiente,

Conservar a 4°C, por un tiempo máximo de 1 mes, dentro de una bolsa de polietileno o caja plástica con tapa, rotulada con el nombre del antibiótico o droga, número de lote y fecha de vencimiento. Proteger de la luz.

Descartar ante cualquier evidencia de deshidratación o contaminación.

Disponer la realización del control de calidad del lote de medio preparado con cepas de referencia (ver el capítulo de Control de calidad interno de este Manual).

Ejemplo:

Carga mensual promedio de trabajo (incluyendo repeticiones):		
Pruebas de nitrato reductasa con I y R	19	
Cantidad de tubos por prueba	5	(3 controles, 1 con I , 1 con R)
Volumen de LJ dispensado por tubo	5 ml	
Volumen de LJ necesario para dos	= 19 * 5 *5 = 475 ml	

Para facilitar el procedimiento, redondear el volumen total de medio de LJ con nitrato de potasio a 500 ml. Estos 500 ml pueden ser separados de un lote de LJ que se prepare en el día, dejando el remanente para ser envasado como LJ común para cultivos o repiques

Agregar a 500 ml de LJ 2,5 ml de la solución stock de nitrato de potasio

Fraccionar en 3 frascos

1 frasco con 300 ml, no tendrá droga y serán empleado para los controles

2 frascos con 100 ml cada uno

Agregar a uno de ellos 0,2 ml de la última dilución de I

Agregar al otro 0,4 ml de la solución madre de R

Para la preparación de los reactivos para el revelado de la prueba de nitrato reductasa, (soluciones 1, 2 y 3) ver el Anexo IV de la parte 2 de este Manual dedicada al cultivo.

Agar Middlebrook 7H10 con antibióticos

Equipamiento

- Cabina de esterilidad,
- Agitador tipo vortex,
- Baño María,
- Propipetas o pipeteador automático.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Marcadores para vidrio punta fina,
- Pipetero para descarte de pipetas,
- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar,
- Pipetas de 1 ml o micropipeta que pueda dispensar 1 ml con punta estéril
1 pipeta o punta por cada dilución 1:10 a realizar,
- Pipetas de 2 ml estériles,
1 por cada antibiótico que integra el lote de medio
- Tubos transparentes de 15 ml, con tapa a rosca, conteniendo 9 ml de agua destilada estéril medidos con exactitud,
1 por cada dilución 1:10 a realizar rotulados con el nombre del antibiótico que corresponda, y la dilución de la solución madre que van a contener (1:10 ó 1:100). Agregar el rótulo "final" a la última dilución necesaria
- Placas de Petri desechables, muy transparentes, estériles, divididas en 4 compartimentos en cantidad suficiente para envasar el volumen total del lote de medio a preparar
Rotular cada cuadrante de cada placa según corresponda: "control" (para el medio sin droga) y el nombre de cada antibiótico que integra el medio.
Ver el esquema sugerido para organizar la distribución de medio en los cuadrantes en el capítulo del Método de las Proporciones en Medio Middlebrook 7H10 de este Manual
- Bolsas de polietileno o cajas plásticas limpias y desinfectadas, con tapa hermética, y capacidad suficiente para preservar el medio.

Reactivos y medio de cultivo

- Solución madre de cada antibiótico que integra el lote de medio a preparar,
Si se emplea una alícuota congelada, retirar del frío con anticipación, para que tome temperatura ambiente antes de ser empleada
- Frasco o erlenmeyer conteniendo 200 ml de Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC, estéril, fundido y mantenido en Baño María a 50-55 °C,
Tantos frascos como sean necesarios para preparar el lote completo de medios sin y con drogas.
Rotular cada frasco con el nombre de cada antibiótico que integra el lote, y con el rótulo "control" para el medio sin droga
No conviene trabajar con fracciones de medio con volumen mayores a los 200 ml porque el agar solidifica rápidamente

Ver arriba, en este Anexo, el método para calcular el volumen de medio necesario

Ver en el Anexo IV de la parte 2 de este Manual, dedicada al cultivo, el método de preparación del medio Middlebrook 7H10.

Procedimiento

Trabajar en cabina de esterilidad desinfectada con alcohol 70°, cuidando muy estrictamente las condiciones de asepsia.

Diluciones de las soluciones madre

- Realizar las diluciones de las soluciones madre de los antibióticos que integran el lote de medio, en el mismo día en que se prepara, según se indica a continuación.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Dilución y agregado de la solución de antibióticos al medio Middlebrook 7H10

	Droga	Concentración solución madre µg/ml	Diluciones a realizar de la solución madre	Concentración de la última dilución µg/ml	Volumen a agregar de la última dilución por cada 200 ml de Middlebrook 7H10 ml	Concentración final del antibiótico en el medio Middlebrook 7H10 µg/ml
1a línea orales	Isoniacida	10.000	dos seriadas 1:10	100	0,4	0,2
	Rifampicina	10.000	dos seriadas 1:10	100	2,0	1,0
	Etambutol	10.000	una 1:10	1.000	1,0	5,0
Inyectables	Dihidroestreptomina	10.000	una 1:10	1.000	0,4	2,0
	Kanamicina	10.000	una 1:10	1.000	0,8	4,0
	Amicacina	10.000	una 1:10	1.000	0,4	2,0
	Capreomicina	10.000	una 1:10	1.000	0,8	4,0
Fluoro quinolonas	Levofloxacina	10.000	dos seriadas 1:10	100	2,0	1,0
	Moxifloxacina	10.000	dos seriadas 1:10	100	1,0	0,5
Otras de segunda línea	Etionamida	10.000	una 1:10	1.000	1,0	5,0
	Linezolid	10.000	dos seriadas 1:10	100	2,0	1,0

- Agitar en vortex todas las soluciones madre de los antibióticos que integran el lote de medio a preparar,
- Seleccionar las soluciones madres de los antibióticos que requieren ser diluidas, ubicarlas en una gradilla y, a continuación de cada una, ubicar el o los tubos de 9 ml rotulados que se requiere(n),
- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Si es necesario, realizar la segunda dilución 1:10. Agitar en vortex el tubo conteniendo 10 ml de la dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml y transferirlo al segundo tubo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:100. Descartar la pipeta o punta,
- Seleccionar las soluciones madres de los antibióticos que no requieren ser diluidas, y las diluciones marcadas con el rótulo “final”, ordenarlas en otra gradilla.

Middlebrook 7H10 con antibióticos

- Tomar el tubo con la solución madre o la dilución “final”, según corresponda, del primer antibiótico. Agitar en vortex,
- Seleccionar el frasco que contiene 200 ml de medio Middlebrook 7H10 LJ rotulado con el nombre de ese antibiótico,
- Con pipeta o micropipeta, transferir dentro de ese frasco el volumen necesario de la solución de antibiótico,
- Homogeneizar completamente, rotando y mezclando cuidadosamente el medio dentro de su envase, manualmente,
- Dispensar rápidamente 5 ml en todos los cuadrantes de las placas rotulados con el nombre del antibiótico con el que se está trabajando. Evitar la formación de burbujas. La capa de agar debe tener una profundidad de 3-4 mm,
- Repetir los 5 pasos anteriores con todos los antibióticos que integran el lote,

- Dispensar el medio sin droga ("control") en los cuadrantes correspondientes,
- Dejar solidificar a temperatura ambiente dentro de la cabina de esterilidad,
- Descartar el remanente de todas las alícuotas de soluciones madre y sus diluciones descongelaadas y empleadas en el día,
- Utilizar de inmediato o conservar las placas invertidas, a 4°C, por un tiempo máximo de 1 mes, dentro de una bolsa de polietileno o caja plástica con tapa, rotulada con el nombre del antibiótico o droga y número de lote. Proteger de la luz. Descartar ante cualquier evidencia de deshidratación o contaminación.

Disponer la realización del control de calidad del lote de medio preparado con cepas de referencia (ver el capítulo de Control de calidad interno de esta Guía).

Medio y reactivos para la prueba de pirazinamidasa

Equipos

- Cabina de esterilidad (preferente) o mechero,
- Autoclave,
- Baño María,
- Propipeta o pipeteador automático.

Materiales

- Marcadores para vidrio con punta fina,
- Guantes de látex o vinilo,
- Pipetero para descarte de pipetas,
- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar la cabina o superficies de trabajo,
- Frasco o erlenmeyer, graduado, con tapa, autoclavable con capacidad que al menos duplique el volumen de medio a preparar,
- Pipeta de 10 ml estéril,
- Tubos de vidrio de 5 ml, anchos, con tapa a rosca cantidad suficiente para el volumen del lote de medio y de reactivo a preparar.

Medio de cultivo

Caldo Dubos preparado con base comercial siguiendo las instrucciones del fabricante sin enriquecimiento	250	ml
Pirazinamida	25	mg
Piruvato de sodio	0,5	g

Ajustar las cantidades según el volumen de medio que se requiera preparar en relación con la carga de trabajo.

- Pesar la Z, el piruvato de sodio y el agar y agregarlos al caldo Dubos,
- Calentar en Baño María a 100oC, hasta fundir el agar y clarificar el medio (aproximadamente 10 minutos),
- Rápidamente, distribuir 2 ml de medio en cada tubo,
- Esterilizar los tubos en autoclave, a 1 atmósfera durante 15 minutos,
- Dejar solidificar con los tubos en posición vertical,
- Conservar 4°C, por un tiempo máximo de 1 mes, dentro de una bolsa de polietileno o caja plástica con tapa, rotulada con el nombre del medio y número de lote. Proteger de la luz. Descartar ante cualquier evidencia de deshidratación o contaminación.

Reactivos

Solución de sulfato de hierro y amonio 1%

Sulfato de hierro y amonio SO ₄ Fe ₂ NH ₄	1	g
Agua destilada	100	ml

Ajustar el peso del sulfato de hierro amonio según la cantidad de moléculas de agua que contenga la formula de la droga disponible

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Disolver el sulfato de hierro y amonio, agitar con vortex,
- Distribuir 2 ml en tubos con tapa a rosca pequeños (o un volumen mayor en el caso en que se realicen varias pruebas por día de trabajo),
- Autoclavar 15 minutos a 1 atmósfera,
- Rotular,
- Conservar a 4°C.

MGIT con antibióticos para equipo MGIT 320 o 960

Pueden ser preparado con los antibióticos provistos por el fabricante del sistema MGIT, siguiendo sus instrucciones, pero verificando que se empleen las concentraciones recomendadas por OMS. Se pueden adquirir kits que permiten ensayar IR, SIRE, PZA y drogas de segunda línea. También se pueden utilizar antibióticos adquiridos de otros proveedores.

A modo de ejemplo se describe la preparación de tubos con el kit SIRE y PZA provistos por el fabricante del equipo. Nótese que el medio y enriquecimiento necesarios para la prueba de Z son diferentes.

Luego, y también a modo de ejemplo, se presenta la opción de preparación de tubos para la realización de PS a drogas de segunda línea, empleando antibióticos de otros proveedores.

Solución madre o stock de los antibióticos provistos por el fabricante

Equipamiento

- Cabina de esterilidad,
- Agitador tipo vortex,
- Propipetas o pipeteador automático,
- Ultracongelador - 20°C o menos.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Pipetero para descarte de pipetas y/o frasco para el descarte de puntas,
- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar la cabina,

- Pipetas de 5 ml,
1 por antibiótico a preparar
- Pipetas o micropipeta con punta estéril, que dispense el volumen que se ha seleccionado para cada alícuota a preservar según la cantidad de PS realizadas diariamente por el laboratorio
- Criotubos, con tapa a rosca, de 2 a 5 ml, cantidad y volumen que convenga en relación con la cantidad de PS que se realicen diariamente en el laboratorio
- Marcador para vidrio punta fina,
- Agua destilada estéril.

Reactivos

- BD BACTEC™ MGIT™ 960 KITSIRE compuesto por:
MGIT Isoniacida (MGIT-I) conteniendo 33,2 µg
MGIT Rifampicina (MGIT-R) conteniendo 332 µg
MGIT Estreptomicina (MGIT-S): 332 µg
MGIT Etambutol (MGIT-E): 1660 µg

o el kit IR compuesto sólo por I y R en las mismas cantidades que las mencionadas

- BD BACTEC™ MGIT™ 960 KIT PZA conteniendo 20.000 µg de Z

Por seguridad , no se recomienda emplear jeringas para hacer las diluciones. Por eso es conveniente retirar el precinto de los frascos y, luego, para disolver la droga, retirar con mucho cuidado su tapón de goma

Procedimiento

Trabajar dentro de una cabina de esterilidad, con superficies desinfectadas, cuidando estrictamente la asepsia.

- Con pipeta, agregar 4 ml de agua destilada estéril al frasco conteniendo I. Descartar la pipeta,
- Con pipeta, agregar 4 ml de agua destilada estéril al frasco conteniendo R. Descartar la pipeta,
- Con pipeta, agregar 4 ml de agua destilada estéril al frasco conteniendo S. Descartar la

pipeta,

- Con pipeta, agregar 4 ml de agua destilada estéril al frasco conteniendo E. Descartar la pipeta,
- Con pipeta, agregar 2,5 ml de agua destilada estéril al frasco conteniendo Z. Descartar la pipeta,
- Mezclar el contenido de cada frasco con agitador tipo vortex y verificar que las drogas queden completamente disueltas,
- Con pipeta o micropipeta, distribuir cada solución madre en criotubos, transfiriendo en cada uno el volumen conveniente según la cantidad de PS que se realicen diariamente en el laboratorio,
- Registrar en la planilla de trabajo el número de lote de cada solución stock, volumen, número de alícuotas preparadas, concentración (8,3 µg/ml para I y 83 µg/ml para R y S y 415 µg/ml para E y 8000 µg/ml para Z), fecha de disolución y fecha de vencimiento,
- Rotular cada criotubo con el nombre del antibiótico y número de lote. Registrar la fecha de vencimiento en el contenedor donde se los ubica,
- Guardar los criotubos a -20°C ó preferentemente a -70°C hasta 6 meses o hasta la fecha de expiración del antibiótico si es anterior. Si se va a preparar medio para la PS en el mismo día, reservar una alícuota sin congelar para ese fin.

MGIT con SIRE

Equipamiento

- Cabina de esterilidad,
- Agitador tipo vortex,
- Micropipetas para dispensar de 100 a 1000 µl.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Frasco para el descarte de puntas,

- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar la cabina,
- Puntas de micropipetas,
- Gradillas de polipropileno limpias y desinfectadas.

Reactivos, medio de cultivo y suplemento

Seleccionar las alícuotas de las drogas que integran las PS a realizar en el día y dejarlas a temperatura ambiente

- Una alícuota de solución stock de S (83 µg/ml),
- Una alícuota de solución stock de I (8,3 µg/ml),
- Una alícuota de solución stock de R (83 µg/ml),
- Una alícuota de solución stock de E (415 µg/ml),
- Suplemento OADC, (ácido oleico 0,6 g/l, albúmina bovina 50 g/l, dextrosa 20g/l y catalasa 0,03 g/l)
Luego de abierto, cerrar y proteger con parafilm todo remanente de OADC que sea guardado para posteriores jornadas de trabajo. Se contamina muy fácilmente
- BD BBL™ MGIT™ Tubo MGIT con 7 ml de medio,
Cantidad necesaria para la realización de las PS programadas para ese día.

Procedimiento

- Ordenar en gradillas y rotular la cantidad de tubos necesarios para las PS programadas para el día, disponiendo un primer tubo "control" (sin droga) y a continuación uno con el rotulo de cada droga a ensayar,
- Con pipeta o micropipeta, adicionar 0,8 ml de OADC en cada tubo MGIT,
- Con micropipeta, agregar 100 µl de la solución de S a cada tubo rotulado con "S",
- Con micropipeta, agregar 100 µl de la solución de I a cada tubo rotulado con "I",
- Con micropipeta, agregar 100 µl de la solución de R a cada tubo rotulado con "R",

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

- Con micropipeta, agregar 100 µl de la solución de E a cada tubo rotulado con “E”,
- Descartar todo remanente de las alícuotas de soluciones stock de los antibióticos descongeladas y empleadas en ese día.

MGIT con Z

Equipamiento

- Cabina de esterilidad,
- Agitador tipo vortex,
- Micropipetas para dispensar de 100 a 1000 µl.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Frasco para el descarte de puntas,
- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar la cabina,
- Puntas de micropipetas,
- Gradillas de polipropileno limpias y desinfectadas.

Reactivos y medio de cultivo y suplemento

- Una alícuota de solución stock de Z (8000 µg/ml),

- Suplemento BACTEC MGIT 960 PZA, (ácido oleico 0,1 g/l, albúmina bovina 50 g/l, dextrosa 20g/l y catalasa 0,03 g/l, estearato de polioxietileno 1,1 g/l)
- BACTEC MGIT 960 PZA con 7 ml de medio, cantidad necesaria para las PS programadas para ese día.

Procedimiento

- Ordenar en gradillas y rotular las series de tubos necesarias disponiendo un primer tubo “control” (sin droga) y a continuación uno con el rotulo Z por cada PS a realizar,
- Con pipeta o micropipeta, adicionar 0,8 ml de Suplemento BACTEC MGIT 960 PZA en cada tubo MGIT 960 PZA,
- Con micropipeta, agregar 100 µl de la solución stock de Z a cada tubo rotulado con “Z”,
- Descartar todo remanente de la alícuota de solución stock de Z descongelada y empleada en el día.

Preparación de MGIT con drogas provistas por el fabricante para el equipo de lectura automatizada MGIT 320/960

	Droga provista por el fabricante en el frasco µg	Agua destilada a agregar ml	Concentración de la solución madre µg/ml	Volumen a agregar de solución madre en cada tubo con 7 ml de MGIT + 0,8 ml de suplemento OADC ml	Concentración final del antibiótico en el medio (a) µg/ml
isoniacida	33,2	4	8,3	0,1	0,1
rifampicina	332	4	83	0,1	1,0
etambutol	1660	4	415	0,1	5,0
estreptomina	332	4	83	0,1	1,0
pirazinamida	20000	2,5	8000	0,1 ^(b)	96,4 ^(c)

a considerando que se agregará 0,5 ml de inóculo

b emplear el medio y suplemento OADC del kit PZA para lograr un pH de 5,9

c sin embargo, la empresa BD consigna que la concentración es de 100 µg/ml en su documentación

MGIT con drogas de segunda línea empleando antibióticos de otros proveedores

Equipamiento

- Cabina de esterilidad,
- Agitador tipo vortex,
- Micropipetas para dispensar de 100 a 1000 µl,
- Propipetas o pipeteador automático.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Frasco para el descarte de puntas,
- Papel absorbente y alcohol 70 para desinfectar la cabina,
- Pipetas de 1 ml,
- Pipetas de 5 ml,
- Pipetas de 10 ml,
- Tubos transparentes de 15 ml con 9,0 ml de agua destilada estéril exactamente medidos, en cantidad necesaria para todas las diluciones 1:10 a realizar rotulados con el nombre del antibiótico que corresponda, y la dilución de la solución madre que van a contener (1:10 ó 1:100); agregar "final" a la ultima dilución necesaria.
- Tubos estériles transparentes de 10 ml, uno por cada droga, rotulados con el nombre del antibiótico soluble en agua y la última dilución que le corresponde; marcar como " final"
Ej Rótulo para K y C : "1: 48 final"
- Tubos estériles transparentes de 5 ml con 900 µl de dimetilsulfoxido exactamente medido en cantidad necesaria para todas las diluciones 1:10 a realizar con las drogas no en agua (clofazimina, bedaquilina y/o delamanid) rotulados con el nombre del antibiótico que corresponda, y la dilución de la solución madre que van a contener (1:10 ó 1:100 ò 1:1000)
- Tubos estériles transparentes de 5 ml
Uno por cada droga no soluble en agua con el nombre del antibiótico y la última dilución que le corresponde; marcar como " final "
Ej Rótulo para clofazimina : "1: 240 final"

- Agua destilada estéril,
- Dimetilformamida (si se ensaya clofazimina, bedaquilina y/o delamanid)
- Puntas de micropipetas,
- Gradillas de polipropileno limpias y desinfectadas.

Reactivos, medio de cultivo y suplemento

- Una alícuota de cada solución madre de cada droga que integra el lote (10.000 µg/ml)
Ver arriba en ese Anexo, bajo el título "Solución madre de los antibióticos e inhibidores selectivos", la forma de preparar estas soluciones.

Si se emplea una alícuota congelada, retirar del frío con anticipación, para que tome temperatura ambiente antes de ser empleada.

- Suplemento OADC
(ácido oleico 0,6 g/l, albúmina bovina 50 g/l, dextrosa 20g/l y catalasa 0,03 g/l)
- BD BBL™ MGIT™ Tubo MGIT con 7 ml de medio
cantidad necesaria para la realización de las PS programadas para ese día

Procedimiento

Trabajar en cabina de esterilidad con superficies de trabajo desinfectadas con alcohol 70°, cuidando muy estrictamente las condiciones de asepsia

Diluciones de las soluciones madre de los antibióticos

- Realizar las diluciones de las soluciones madre de los antibióticos que integran el lote de medio, en el mismo día en que se prepara, según se indica a continuación:

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Dilución y agregado de la solución de antibióticos al MGIT

	Concentración solución madre	Diluciones a realizar de la solución madre		Concentración de la dilución final	Volumen a agregar de la dilución final en cada tubo con 7 ml de MGIT + 0,8 ml de suplemento OADC	Concentración final del antibiótico en el medio (*)
	µg/ml			µg/ml	ml	µg/ml
Kanamicina	10.000	una 1:10	una 1:4,8	208	0,1	2,5
Amicacina	10.000	dos seriadas 1:10	una 1:1,2	83	0,1	1,0
Capreomicina	10.000	una 1:10	una 1:4,8	208	0,1	2,5
Levofloxacin	10.000	dos seriadas 1:10	una 1:1,2	83	0,1	1,0
Moxifloxacin	10.000	dos seriadas 1:10	una 1:4,8	21	0,1	0,25
Gatifloxacin	10.000	dos seriadas 1:10	una 1:4,8	21	0,1	0,25
Etionamida	10.000	una 1:10	una 1:2,4	417	0,1	5,0
Protionamida	10.000	una 1:10	una 1:4,8	208	0,1	2,5
Linezolid	10.000	dos seriadas 1:10	una 1:1,2	83	0,1	1,0
Clofazimina	10.000	dos seriadas 1:10	una 1:1,2	83	0,1	1,0
Bedaquilina	10.000	dos seriadas 1:10	una 1:1,2	83	0,1	1,0
Delamanid	10.000	tres seriadas 1:10	una 1:2	5	0,1	0,06

(*) considerando que se agregará 0,5 ml de inóculo

- Agitar en vortex todas las soluciones madre de los antibióticos que integran el lote de medio a preparar
- Ubicar en una gradilla las drogas que van a ser diluidas en agua y a continuación de cada una ubicar el o los tubos con 9 ml de agua rotulados que se requiere(n) para realizar la(s) diluciones 1:10, y un tubo adicional para realizar dilución final
- Ubicar en otra gradilla las drogas que van a ser diluidas en dimetilsulfóxido y a continuación de cada una ubicar el o los tubos de 5 ml rotulados que se requiere(n) para realizar la(s) diluciones 1:10, y un tubo adicional para realizar dilución final
- Rotular cada tubo ordenado en serie con el nombre del antibiótico y dilución que contendrá, Marcar la última dilución como "final"

K, C

- Para realizar la dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agitar con vortex
- Transferir 1 ml de la dilución 1:10 del antibiótico

al tubo vacío rotulado como "1:48 final"

- Agregar a este último tubo 3,8 ml de agua destilada estéril
- Agitar con vortex

A, Lvx, linezolid

- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agitar con vortex
- Realizar la segunda dilución 1:10, tomando con pipeta ó micropipeta 1 ml de la dilución 1:10, transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:100. Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agitar con vortex
- Realizar la tercera dilución tomando con pipeta ó micropipeta 1 ml de la dilución 1:100 y transferirlo al tubo contiguo vacío y rotulado "1:120 "final" Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agregar al tubo rotulado "final" 0,2 ml de agua destilada estéril
- Agitar con vortex

Mfx

- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agitar con vortex
- Realizar la segunda dilución 1:10, tomando con pipeta ó micropipeta 1 ml de la dilución 1:10, transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:100. Descartar la pipeta o punta utilizada
- Realizar la ultima dilución tomando con pipeta ó micropipeta 1 ml de la dilución 1:100 y transferirlo al tubo contiguo , vacío rotulado "1:480 final". Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agregar al tubo rotulado "final" 3,8 ml de agua destilada estéril
- Agitar con vortex

Etionamida

- Para realizar la dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agitar con vortex
- Transferir 1 ml de la dilución 1:10 del antibiótico al tubo vacío rotulado como "1:24 final"
- Agregar a este último tubo 1,4 ml de agua destilada estéril
- Agitar con vortex

Protionamida

- Para realizar la dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agitar con vortex
- Transferir 1 ml de la dilución 1:10 del antibiótico al tubo vacío rotulado como "1:48 final"
- Agregar a este último tubo 3,8 ml de agua destilada estéril
- Agitar con vortex

Bedaquilina

- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con micropipeta 100 µl de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 900 µl de dimetilsulfoxido rotulado 1:10. Descartar la punta utilizada
- Agitar con vortex
- Realizar la segunda dilución 1:10 tomando con pipeta ó micropipeta 100 µl de la dilución 1:10 y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 900 µl de dimetilsulfoxido rotulado 1:100. Descartar la punta utilizada
- Realizar la ultima dilución tomando con pipeta ó micropipeta 500 µl de la dilución 1:100 y transferirlo al tubo contiguo vacío y rotulado "1:120 final" Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agregar al tubo rotulado "final" 100 µl de dimetilsulfoxido
- Agitar con vortex

Delamanid

- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con micropipeta 100 µl de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 900 µl de dimetilsulfoxido rotulado 1:10. Descartar la punta utilizada
- Agitar con vortex
- Realizar la segunda dilución 1:10 tomando con pipeta ó micropipeta 100 µl de la dilución 1:10 y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 900 µl de dimetilsulfoxido rotulado 1:100. Descartar la punta utilizada
- Realizar la tercera dilución 1:10 tomando con pipeta ó micropipeta 100 µl de la dilución 1:100 y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 900 µl de dimetilsulfoxido rotulado 1:1000 Descartar la punta utilizada
- Realizar la ultima dilución tomando con pipeta ó micropipeta 500 µl de la dilución 1:100 y transferirlo al tubo contiguo vacío y rotulado "1:2000 final" Descartar la pipeta o punta utilizada
- Agregar al tubo rotulado "final" 500 µl de dimetilsulfoxido
- Agitar con vortex

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Nota : en laboratorios con muy alta carga de trabajo se deberá multiplicar las cantidades indicadas para hacer la dilución final por un factor, de manera que se obtenga el volumen necesario para preparar todos los tubos de MGIT con droga que deben prepararse en cada jornada de trabajo.

MGIT con drogas

- Ordenar en gradillas y rotular la cantidad de tubos necesarios para las PS programadas para el día, disponiendo un primer tubo "control" (sin droga) y a continuación uno con el rotulo de cada droga a ensayar
- Con micropipeta, adicionar 0,8 ml de OADC en cada tubo MGIT.
- Agitar con vortex la dilución "final" de la primera droga y con micropipeta, agregar 100 µl de esa solución a cada tubo rotulado con el nombre de esa droga
- Proceder de igual forma con cada una de las drogas a ensayar
- Agitar con vortex todos los tubos de MGIT preparados para la PS
- Descartar los remanentes de las alícuotas de las soluciones madre o stock descongeladas y sus diluciones

MGIT con antibióticos para lectura visual con lámpara UV

Equipamiento

- Cabina de esterilidad,
- Agitador tipo vortex,
- Micropipetas para dispensar de 100 a 1000 µl,
- Propipeta o pipeteador automático.

Materiales

- Guantes de látex o vinilo,
- Frasco para el descarte de puntas,
- Papel absorbente y alcohol 70° para desinfectar la cabina,
- Pipetas de 1 ml,
- Tubos con 9,0 ml de agua destilada estéril exactamente medidos, en cantidad necesaria para todas las diluciones 1:10 a realizar rotulados con el nombre del antibiótico y las

diluciones que contendrán

Rotulo para I : 1:10, 1:100 y 1:1000

Rótulo para R : 1:10, 1:100

- Dos tubos estériles de 10 ml, rotulados con el nombre del antibiótico y la última dilución que le corresponde, marcar como " final "
- Rótulo para I : "1:2000 final"
- Rótulo para R : "1:200 final"
- Agua destilada estéril,
- Puntas de micropipetas,
- Gradillas de polipropileno limpias y desinfectadas.

Reactivos, medio de cultivo y suplemento

- Una alícuota de solución madre de I 10.000 µg/ml,
- Una alícuota de solución madre de R 10.000 µg/ml),

Ver arriba en ese Anexo, bajo el titulo "Solución madre de los antibióticos e inhibidores selectivos" la forma de preparar estas soluciones

Si se emplea una alícuota congelada, retirar del frio con anticipación, para que tome temperatura ambiente antes de ser empleada

- Suplemento OADC para prueba de sensibilidad (ácido oleico 0,6 g/l, albúmina bovina 50 g/l, dextrosa 20g/l y catalasa 0,03 g/l),
- Tubo MGIT™ BD BBL con 4 ml de medio, cantidad necesaria para la realización de las PS programadas para ese día

Procedimiento

Trabajar en cabina de esterilidad con superficies de trabajo desinfectadas con alcohol 70°, cuidando muy estrictamente las condiciones de asepsia.

Diluciones de las soluciones madre de los antibióticos

- Realizar las diluciones de las soluciones madre de los antibióticos que integran el lote de medio, en el mismo día en que se prepara, según se indica a continuación.

Dilución y agregado de la solución de antibióticos al MGIT para lectura visual

	Concentración solucion madre µg/ml	Diluciones a realizar de la solucion madre	Concentración de la dilución final µg/ml	Volumen a agregar de la dilución final en cada tubo con 4 ml de MGIT + 0,5 ml de suplemento OADC ml	Concentración final del antibiótico en el medio µg/ml
Isoniacida	10.000	tres seriadas 1:10 una 1:2	5	0,1	0,1
Rifampicina	10.000	dos seriadas 1:10 una 1:2	50	0,1	1

GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

- Ubicar las soluciones madre de los antibiótico en una gradilla y a continuación de cada una, ubicar los tubos de 9 ml rotulados que se requieren para realizar las diluciones 1:10, y al final un tubo vacío para realizar la dilución final,

I 5 µg/ml

- Agitar en vortex las solución madre de I,
- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua rotulado 1:10. Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Agitar con vortex,
- Realizar la segunda dilución tomando con pipeta ó micropipeta 1 ml de la dilución 1:10 y transferirlo al tubo contiguo rotulado "1:100". Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Agitar con vortex,
- Realizar la tercera dilución tomando con pipeta ó micropipeta 1 ml de la dilución 1:100, transferirlo al tubo contiguo con 9 ml de agua, rotulado " 1:1000". Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Agitar con vortex,
- Con micropipeta o pipeta, transferir 1 ml de dilución 1:1000 al último tubo vacío, rotulado "I 1:2000 final ". Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Agregar al último tubo 1 ml de agua destilada estéril,
- Agitar con vortex.

R 50 µg/ml

- Agitar en vortex la solución madre de R.
- Para realizar la primera dilución 1:10, tomar con

pipeta ó micropipeta 1 ml de la solución madre y transferirlo al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado "1:10". Descartar la pipeta o punta utilizada,

- Agitar con vortex,
- Transferir con pipeta ó micropipeta 1 ml de la dilución 1:10 al tubo contiguo conteniendo 9 ml de agua destilada rotulado "1:100". Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Agitar con vortex,
- Con micropipeta o pipeta, transferir 1 ml de la dilución 1:100 al último tubo vacío rotulado "1:200 final". Descartar la pipeta o punta utilizada,
- Agregar al último tubo 1 ml de agua destilada estéril,
- Agitar con vortex.

MGIT con I y R

- Ordenar en gradillas y rotular la cantidad de tubos necesarios para las PS programadas para el día, disponiendo un primer tubo "control" (sin droga) y a continuación uno con el rotulo de "I" y otro con el rótulo "R",
- Con micropipeta, adicionar 0,5 ml de OADC en cada tubo MGIT,
- Agitar con vortex la dilución "final " de I y con micropipeta, agregar 100° I de esa solución cada tubo rotulado con "I",
- Agitar con vortex de la dilución "final " de R y con micropipeta, agregar 100° I de esa solución cada tubo rotulado con "R",
- Agitar con vortex todos los tubos de MGIT preparados para la PS.

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Registro Recepcion y uso insumos sistema MGIT												
Reactivo	Recepcion			Control de calidad				Uso				
	Fecha	cantidad	lote	Observaciones (*)	Responsable	Fechas	Registro N°	aprobado si/no	Observaciones (*)	Responsable	Fecha comienzo	Fecha finalizacion
Tubos MGIT												
Kit IR												
Kit SIRE												

**GUÍA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS**

Registro Recepcion y uso insumos sistemas moleculares

	Recepción				Errores registrados con los controles diarios				Uso			
	Fecha	cantidad	lote	Observaciones (*)	Resonsable	Fecha	Registro N°	tipo de error	Observaciones (*)	Resonsable	Fecha comienzo	Fecha de finalización
Cartuchos GeneXpert MTB/Rif												
Kit LPA												

(*) anomalias y acciones consecuentes

