Ministerio de Salud
Hospital Nacional
"Hipólito Unanue"

Nº 073-2022-HNHU-DG

Resolución Directoral

Lima 28 de Marzo de 2022

Visto el Expediente Nº 21-020129-001, que contiene el Memorando Nº 270-2022-DPCYAP/HNHU, emitido por la jefa del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, a través del cual solicita la aprobación del proyecto de la "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis" del Hospital Nacional Hipólito Unanue, mediante acto resolutivo;

CONSIDERANDO:

Que, los numerales I y II del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud disponen que la salud es condición indispensable del desarrollo humano y medio fundamental para alcanzar el bienestar individual y colectivo, y que la protección de la salud es de interés público. Por tanto, es responsabilidad del Estado regularla, vigilarla y promoverla;

Que, los artículos 76° y 79° de la Ley Nº 26842, Ley General de Salud, establecen que la Autoridad de Salud de nivel nacional es responsable de dirigir y normar las acciones destinadas a evitar las propagación y lograr el control y erradicación de las enfermedades transmisibles en todo el territorio nacional, ejerciendo la vigilancia epidemiológica e inteligencia sanitaria y dictando las disposiciones correspondientes, estando asimismo facultada a dictar las medidas de prevención y control para evitar la aparición y propagación de enfermedades transmisibles, quedando todas las personas naturales o jurídicas obligadas al cumplimiento de dichas medidas;

Que, con Resolución Ministerial Nº 826-2021/MINSA, se aprobó el Documento denominado "Normas para la Elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud", cuyo objetivo general es establecer las disposiciones relacionadas con los procesos de formulación, aprobación, modificación y difusión de los documentos normativos que expide el Ministerio de Salud, siendo de observancia obligatoria por los órganos, unidades orgánicas y órganos desconcentrados del Ministerio de Salud;

Que, el punto 6.1.3. del citado documento normativo, define a la Guía Técnica como el Documento Normativo con el que se define por escrito y de manera detallada el desarrollo de determinados procesos, procedimientos y actividades administrativas, asistenciales o sanitarias. En ella se establecen metodologías, instrucciones o indicaciones que permite al operador seguir un determinado recorrido, orientándolo al cumplimiento del objetivo de un proceso, procedimientos o actividades, y al desarrollo de una buena práctica;

Que, con Memorando Nº 270-2022-DPCYAP/HNHU, la jefa del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, propone la aprobación del proyecto de la "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis" del Hospital Nacional Hipólito Unanue;

S. VARGAS

Que, con Nota Informativa N° 063-2022-OGC/HNHU, de fecha 14 de febrero de 2022, la Jefa (e) de la Oficina de Gestión de la Calidad adjunta el Informe Nº 045-2022-KMGM/HNHU, en el cual informa que el proyecto de Guía Técnica elaborado por el Servicio de Microbiología, Inmunología y Biología Molecular del Departamento de Patología y Anatomía Patológica, ha sido evaluado y se encuentra acorde de manera estructural a los lineamientos planteados en las "Normas para la Elaboración de documentos Normativos del Ministerio de Salud" aprobado mediante Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA, precisando además con Memorando N° 159-2022-OGC/HNHU que : "*el documento Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis no puede llevar el nombre de Guía de Práctica Clínica, ya que no describe este procedimiento Patologías y Tratamientos*", por lo que solicita la aprobación del documento propuesto, mediante acto resolutivo presentado;

Estando a lo informado por la Oficina de Asesoría Jurídica en su Informe Nº 070-2022-OAJ/HNHU;

Con el visto bueno de la jefa del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, de la jefa (e) de la Oficina de Gestión de la Calidad y de la jefa de la Oficina de Asesoría Jurídica; y,

De conformidad con lo dispuesto por la Ley Nº 26842, Ley General de Salud y de acuerdo a las facultades establecidas en el Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Hipólito Unanue, aprobado por Resolución Ministerial Nº 099-2012/MINSA;

SE RESUELVE:

Artículo 1.-APROBAR la "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis" del Hospital Nacional Hipólito Unanue, la misma que forman parte de la presente Resolución y por los fundamentos expuestos en la parte considerativa.

Artículo 2.-ENCARGAR al Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, la ejecución y seguimiento de la Guía de Procedimiento Asistencial aprobada por el artículo 1° de la presente Resolución.

Artículo 3.-DISPONER que la Oficina de Comunicaciones proceda a la publicación de la presente Resolución en la Página Web del Hospital.

Regístrese y comuníquese.

MINISTERIO DE SALUD
Hospital Nacional Hipólito Unanue
Dr. José Alejandro TORRES ZUMAETA
Director General
C.M.P. N° 12633

JATZ/TCS/snn
DISTRIBUCIÓN.
( ) D. Adjunta
( ) Dpto. de Patología Clínica y Anatomía Patológica
( ) OAJ.
( ) Of., Gestión de la Calidad
( ) OCI
( ) Archivo.

MINISTERIO DE SALUD

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA, INMUNOLOGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

LABORATORIO DE MICOBACTERIAS Y BIOLOGÍA MOLECULAR

GUIA TECNICA: PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE PRUEBAS MOLECULARES PARA DIAGNOSTICO Y SUSCEPTIBILIDAD DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Lima, 2022

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR DE PRUEBAS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO Y SUSCEPTIBILIDAD DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Equipo de Gestión del Hospital Nacional Hipólito Unanue

M.C.José Alejandro Torres Zumaeta
Director General

M.C.José Alejandro Torres Zumaeta
Director Adjunto

Eco. Yovanna Miranda Castillo
Directora Administrativa

M.C. Silvia Paola Vargas Chugo
Jefa de la Oficina de Gestión de la Calidad

Grupo Evaluador de la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium tuberculosis

M.C. Gladys Leandra Patiño Soto
Jefa del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica

M.C. Astrid Rodríguez Agreda
Jefa del Servicio de Microbiología, Inmunología y Biología Molecular

M.C. Rosa Vilma Acurio Usca
Médico Asistente del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR DE PRUEBAS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO Y SUSCEPTIBILIDAD DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Indice

I. Finalidad....1
II. Objetivo....2
III. Ámbito de aplicación....2
IV. Nombre del Proceso a Estandarizar....2
V. Consideraciones generales....2
5.1 Definiciones operativas....3
5.2 Siglas....3
VI. Consideraciones específicas....7
6.1 Medidas de Bioseguridad....7
6.2 Tipo de muestra, transporte y conservación....10
6.3 Procedimientos de laboratorio para diagnóstico molecular de tuberculosis....11
6.3.1 Ensayo de sonda en línea GenoTypeMTBDR*plus* para la identificación y detección de resistencia a rifampicina y/o isoniacida del complejo *Mycobacterium tuberculosis*....11
6.3.2 Amplificación del ácido nucleico en tiempo real automatizado para la detección simultánea de *Mycobacterium tuberculosis*...y resistencia a la rifampicina – XPERT – MTB/RIF....24
6.4 Control de Calidad de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico molecular de la tuberculosis....29
6.4.1 Ensayo de sonda en línea GenoTypeMTBDR*plus* para la identificación y detección de resistencia a rifampicina y/o isoniacida del complejo *Mycobacterium tuberculosis*....29
6.4.2 Amplificación del ácido nucleico en tiempo real automatizado para la detección simultánea de *Mycobacterium tuberculosis*...y resistencia a la rifampicina – XPERT – MTB/RIF....31
VII. Recomendaciones....34
VIII. Anexos....35
IX. Bibliografía....51

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR DE PRUEBAS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO Y SUSCEPTIBILIDAD DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

I. Finalidad

La Tuberculosis, y su farmacorresistencia asociada, es una preocupación importante para la Salud Pública y una amenaza al progreso mundial hacia el logro del nuevo objetivo de eliminación de la TB por parte de la OMS. Las innovaciones tecnológicas y la sólida ciencia que las respaldan son importantes avances en el diagnóstico de la TB de los últimos 10 años, El logro de los objetivos de la OMS, en su estrategia de la lucha contra la TB, requiere una ampliación urgente de estas innovaciones en todos los niveles y en todos los escenarios para el diagnóstico rápido de la misma y la detección de la resistencia a fármacos en todas las personas con signos o síntomas de esta enfermedad.

Los métodos de diagnóstico de la tuberculosis se basan en la utilización combinada de la baciloscopía y el cultivo, pero ambos presentan sus limitaciones, el primero por su sensibilidad la cual oscila entre 50 y 70% y el segundo por el extenso tiempo de crecimiento desde tres hasta ocho semanas. Además, las formas extrapulmonares de esta enfermedad son más críticas, debido a la naturaleza paucibacilar de las muestras.

En la actualidad, las pruebas moleculares basadas en la amplificación de los ácidos nucleicos se han convertido en herramientas diagnósticas importantes que determinan la resistencia farmacológica mediante la detección de mutaciones genéticas, pero requieren personal entrenado, infraestructura adecuada, reactivos y equipos. Esto dificulta su uso como pruebas de rutina para la mayoría de las instituciones prestadoras de servicios de salud del país, con excepciones de los laboratorios centrales o nacionales que ya cuentan con plataformas diagnósticas de biología molecular.

La OMS recomienda el uso de los ensayos de sondas en línea para la identificación y detección de resistencia de las micobacterias como es el caso de los ensayos Genotype MTBDR*plus*v2.0 y Genotype MTBDR*sl*v2.0 que permiten el diagnóstico de la TB-MDR y la TB-XDR.

Otra de las pruebas moleculares recomendadas por la OMS es el ensayo Xpert® MTB/RIF, el cual permite diagnosticar la tuberculosis pulmonar y extrapulmonar (especialmente líquido cefalorraquídeo), además de detectar la resistencia frente a rifampicina, en poblaciones vulnerables (personas con VIH, personas con diabetes, personas privadas de su libertad y contactos de pacientes con tuberculosis drogorresistentes, tanto adultos como niños).

II. Objetivo

El objetivo de esta guía técnica del Procedimiento Operativo estándar para el Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis, es estandarizar los procedimientos técnicos de pruebas moleculares, en el diagnóstico de la tuberculosis y la detección de resistencia frente a fármacos antituberculosos, en el Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular (Laboratorio del Cenex) del HNHU, que forma parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública

III. Ámbito de aplicación

La presente Guía Técnica de Procedimiento Operativo Estándar para el Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis, deberá ser aplicado en el Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular del Hospital Nacional Hipólito Unanue, donde el personal profesional Biólogo, Tecnólogo médico y técnico de laboratorio del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular, ejecutará el ensayo con muestras pulmonares, para el Diagnóstico de la Tuberculosis y la detección de la resistencia frente a fármacos antituberculosos, ya que este Laboratorio ha sido implementado y ha cumplido con los requisitos para la Transferencia Tecnológica de Pruebas rápidas moleculares (Genotype y GenXpert) y forma parte de la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública (5,6)

IV. Nombre del Proceso a Estandarizar

CODIGO CPT: 87556 (Detección de Agente Infeccioso por medio de Ácidos Nucleicos (ADN ó ARN): Mycobacterium tuberculosis, Técnica de Evaluación con Amplificación) para GENOTYPE
CODIGO CPT: 87556.01 (

En la presente "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis del Hospital Nacional Hipólito Unanue" se describen las técnicas que corresponden a los **CODIGOS CPT: 87556 y CPT: 87556.01**.

V. Consideraciones generales

La TB es causado por cepas pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y puede afectar a los pulmones (tuberculosis pulmonar), así como otras partes del cuerpo (tuberculosis extrapulmonar). En su forma pulmonar es de gran importancia por su frecuencia y porque constituye la principal fuente de contagio. La persistencia de la tuberculosis está asociada a varios factores, entre los que destacan los problemas socioeconómicos, el descuido de los Programas de Control, el aumento de la coinfección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana y el creciente aumento de la resistencia a los fármacos antituberculosis. Además, la circulación de cepas multidrogorresistentes, y el aumento de cepas extensamente drogorresistentes, vuelven más difícil el control de esta enfermedad (1).

El cultivo microbiológico sigue considerándose el 'estándar de oro' para el diagnóstico de tuberculosis en todas sus formas; sin embargo, el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* es muy lento, obteniéndose resultados entre las tres y ocho semanas de incubación de las muestras clínicas. Por otro lado, la baciloscopía es un método de bajo costo de implementación y rápida obtención de resultados, pero con una baja sensibilidad diagnóstica (2). Tomando en cuenta estos antecedentes, las técnicas de detección rápida de *Mycobacterium* tuberculosis, y de resistencia a rifampicina y/o isoniacida, serían de gran utilidad, considerando que el diagnóstico temprano tiene gran impacto en el manejo, pronóstico y evolución de la enfermedad, además de contribuir a la disminución de la transmisión de la infección 'persona – persona' y, consecuentemente, a la expansión de la tuberculosis farmacorresistente (3).

Los avances en el campo de la Biología Molecular, y progresos en el estudio de las bases genéticas de la resistencia, proveen herramientas útiles para el diagnóstico oportuno de la tuberculosis, así como la detección de la farmacorresistencia, siendo estas técnicas moleculares de gran utilidad porque permiten un diagnóstico más rápido y oportuno (4).

5.1. Definiciones operativas

Amplicón: fragmento específico de ADN, de un organismo objetivo, que se copia millones de veces mediante la PCR. La secuencia de estos fragmentos amplificados proporciona información detallada sobre las variantes nucleotídicas presentes en determinadas regiones génicas de interés

Bioseguridad: proceso de aplicar una combinación de controles administrativos, principios de contención, prácticas y procedimientos, equipo de seguridad, preparación para emergencias e instalaciones adecuadas que permitan que el personal del laboratorio trabaje de manera segura con microorganismos potencialmente infecciosos. La bioseguridad también tiene como objetivo prevenir la exposición no intencional a patógenos o su liberación accidental.

Cepa: variante genética o subtipo de un microorganismo, usualmente propagada clonalmente.

Ciclo Umbral (Ct): del inglés '*thresholdcycle*', es el número de ciclos donde la fluorescencia de los productos amplificados sobrepasa la fluorescencia basal. El Ct es inversamente proporcional al cuadrado de la cantidad inicial de ADN.

Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB): grupo de especies micobacterianas que comparten una alta identidad genética y son causantes de la tuberculosis tanto en el hombre como en los animales.

Hibridación reversa: unión complementaria de las moléculas diana (ácidos nucleicos de secuencia no conocida) con las moléculas de la sonda (ácidos nucleicos de secuencia conocida) inmovilizadas en un soporte sólido, como tiras de nitrocelulosa. Esta unión depende de la complementariedad de bases y de la temperatura.

ESL GenoTypeMTBDR*plus v2.0*: ensayo molecular cualitativo in vitro usado para la identificación *in vitro* del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a rifampicina (R) y/o isoniacida (H) a partir de muestras clínicas y cultivos.

ESL GenoTypeMTBDR*sl*v2.0: ensayo molecular cualitativo usado para la identificación *in vitro* del complejo *M. tuberculosis* y su resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos/péptidos cíclicos a partir de muestras de esputo con baciloscopía positiva, cultivos aislados en medios sólidos (Löwenstein-Jensen, Ogawa) y en medio líquido (BACTEC MGIT 960).

Xpert® MTB/RIF: Ensayo cualitativo y semicuantitativo para la detección de ADN de *M. tuberculosis* y resistencia a Rifampicina de manera simultánea mediante PCR en tiempo real.

Locus: posición particular en un genoma que determina la ubicación de un gen o un marcador molecular. El plural de locus es 'Loci'.

Muestra biológica: cualquier material biológico susceptible de conservación y que pueda albergar información sobre la dotación genética característica del organismo. Incluye sangre y sus derivados, orina, tejidos u órganos y sus remanentes, obtenido dentro de un ensayo clínico.

Mutación génica: alteración permanente de la secuencia de ADN que conforma un gen.

NETLAB: sistema de información electrónica que, a través de la web, permite consultar los resultados de las pruebas de laboratorio realizadas por el Instituto Nacional de Salud (INS) y la Red de Laboratorios de Referencia. Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis

PCR: del inglés *PolymeraseChainReaction*, es una técnica molecular utilizada para la amplificación exponencial de un segmento específico de ADN mediante múltiples ciclos de síntesis de ADN a partir de oligonucleótidos cebadores cortos.

PCR en tiempo real: también llamada 'PCR cuantitativa', es una PCR donde los procesos de amplificación exponencial y detección de productos fluorescentes se realizan de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, debido a que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado se puede determinar en tiempo real la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo.

Pruebas moleculares: son pruebas de laboratorio utilizadas para determinar la existencia de moléculas diana, tales como ADN, ARN y proteínas, en muestras biológicas. Sirven para el diagnóstico de distintas enfermedades y caracterización de alteraciones génicas que conducen a la resistencia frente a determinados fármacos.

Resistencia antimicrobiana: capacidad que tienen los microorganismos (bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los compuestos antimicrobianos (antibióticos, antivíricos y antipalúdicos) actúen en contra de ellos. Debido a esto, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otros.

Sintomático Respiratorio: persona que presenta tos y flema por 15 o más días.

Sonda: fragmento definido de ADN o ARN, marcado en forma radioactiva o química, que se utiliza para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante técnicas de hibridación.

Tuberculosis (TB): enfermedad infecciosa causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* y se contagia de persona a persona a través de gotas microscópicas liberadas en el aire. En el 80 - 85 % de

casos diagnosticados afecta a los pulmones; sin embargo, puede manifestarse en cualquier órgano ya que el bacilo tiene la capacidad de diseminarse por todo el organismo.

Tuberculosis pulmonar: enfermedad infecciosa diagnosticada en personas a quienes se le diagnostica con Tuberculosis con compromiso del parénquima pulmonar con o sin confirmación bacteriológica (baciloscopía, cultivo o prueba molecular).

Tuberculosis sensible: tipo de tuberculosis, cuyo patrón de susceptibilidad no muestra resistencia a los medicamentos antituberculosis de primera línea.

Tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR): caso de TB con resistencia simultánea a isoniacida y rifampicina por pruebas rápidas.

Tuberculosis extensamente drogorresistente (TB-XDR): caso de TB con resistencia simultánea a isoniacida, rifampicina, una fluoroquinolona y un inyectable de segunda línea detectada por pruebas rápidas moleculares o convencionales.

5.2 SIGLAS:

AC Control de amplificación
ADN Ácido desoxirribonucleico
AG Aminoglucósido
A-LYS Buffer de lisis
Am Amikacina
AM-A Mezcla de amplificación A
AM-B Mezcla de amplificación B
A-NB Buffer de neutralización
ARN Ácido ribonucleico
AS Especies adicionales de micobacterias
ATCC Colección americana de cultivos referenciales
BK Baciloscopía
CC Control de conjugado
Cm Capreomicina
CM Micobacterias comunes
CMTB Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
CON-C Conjugado concentrado
CON-D Tampón de conjugado
CP Péptido cíclico
CSB Cabina de seguridad biológica
Ct Ciclo umbral
DEN Solución de desnaturalización
EPP Equipo de protección personal

ESL Ensayo de Sonda en Línea

ESN PCT Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis

FLQ Fluoroquinolona

GC Control de Género

GX Software 'GeneXpertDx'

H Isoniacida

HYB Tampón de hibridación

INS Instituto Nacional de Salud

Km Kanamicina

Lfx Levofloxacina

LJ Löwestein – Jensen

LRNM Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias

Mfx Moxifloxacina

MNT Micobacterias No Tuberculosas

MTB *Mycobacterium tuberculosis*

MUT sonda tipo mutante

NALC N-Acetil L-Cisteina

NBS-2 Nivel 2 de bioseguridad

OMS Organización Mundial de la Salud

PCC Control de verificación de la sonda

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCR-RT Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

PNM Mezcla del Primer/Nucleótidos

R Rifampicina

RD1 Región de diferenciación 1 de MTB

RIN Solución de aclarado

SUB-C Sustrato concentrado

SUB-D Tampón de sustrato

TB Tuberculosis

TB-MDR Tuberculosis multidrogoresistente

TB-XDR Tuberculosis extensamente drogorresistente

TUB Banda de Identificación del Complejo *M. tuberculosis*

UC Banda de Control Universal

UFC Unidades Formadoras de Colonias

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VmViomicinaWT Sonda tipo silvestre

(23)

VI. Consideraciones especificas

6.1. Medidas de Bioseguridad

Las medidas de bioseguridad, son normas destinadas a reducir el riesgo de transmisión de microorganismos de fuentes reconocidas o no reconocidas de infección en los servicios de salud, vinculadas a accidentes por exposición a muestras biológicas cuando se realizan pruebas de diagnóstico de TB. Involucra a todos los miembros del equipo tanto asistencial como administrativo y tiene como finalidad disminuir o eliminar todo riesgo de contagio de la enfermedad (7).

El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico bacteriológico debe cumplir las medidas de bioseguridad, así como usar los EPPs adecuados, según lo establecido en el Manual de Normas de Bioseguridad (Serie de Normas Técnicas Nº 18), elaborado por el INS (8) y en el Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis de la OMS publicada en el año 2013 (9)

Toda muestra que ingresa al Laboratorio de Tuberculosis para su proceso debe ser considerada como potencialmente infecciosa. Es importante mencionar que el método descrito debe de seguir las medidas de bioseguridad esenciales para los laboratorios de TB, las cuáles se encuentran detalladas en el manual de bioseguridad en el laboratorio de Tuberculosis de la OMS (9).

Las principales consideraciones que se deben tener en cuenta cuando se trabaja en un laboratorio que manipula cepas de MTB son medidas que deben de minimizar **el riesgo de infección en el laboratorio REDUCIENDO AL MINIMO LA PRODUCCION DE AEROSOLES.**

Algunas de las medidas prácticas para reducir la creación de aerosoles se aplican a todos los laboratorios de tuberculosis, mientras que otras se aplican sólo a los laboratorios que se consideran de riesgo moderado o alto.

<u>En todos los laboratorios</u>

• Al preparar frotis, es preferible utilizar palillos de madera o asas desechables en lugar de asas reutilizables. Si se emplea un asa reutilizable, debe esterilizarse por calor en un microincinerador cerrado o un mechero Bunsen. Las asas reutilizables se limpiarán en un frasco de arena y alcohol antes de la esterilización.

• Cuando se prepare un frotis utilizando un palillo o asa, se harán movimientos lentos y suaves para evitar la creación de aerosoles.

• No se moverán ni fijarán con calor los frotis hasta que se hayan secado al aire por completo.

<u>En los laboratorios de riesgo de tuberculosis moderado y alto</u>

• No se expulsarán con fuerza líquidos infecciosos de una pipeta.

• No se introducirá con fuerza aire de una pipeta en líquidos potencialmente infecciosos. • Cuando se utilice una pipeta para añadir un reactivo a un líquido potencialmente infeccioso, se apoyará la pipeta contra la pared interior del recipiente y se dejará salir el líquido suavemente

• Se evitará siempre romper una burbuja o película en un tubo de cultivo abierto. Para ello se colocará de nuevo el tapón, se darán unos golpes suaves en la parte superior del tubo, se dejará el tubo a un lado y se permitirá que los posibles aerosoles que se hayan generado se depositen antes de abrirlo de nuevo.
• Cuando se centrifugue una muestra o un cultivo, se hará en una cubeta de seguridad cerrada o un rotor cerrado para evitar la liberación de aerosoles a la centrifugadora y el laboratorio. Las cubetas de seguridad o los rotores se abrirán dentro de una CSB.
• Después de centrifugar, agitar con vórtex o mezclar muestras o cultivos, se colocarán los recipientes en la CSB y se dejarán reposar durante un mínimo de 10 minutos para permitir que los aerosoles se depositen antes de abrir los recipientes.
• Nunca se agitará con vórtex un tubo abierto; habrá que asegurarse siempre de que los tapones de rosca están bien apretados en los tubos antes de colocar en el vórtex o agitar. No se agitarán con vórtex tubos tapados con algodón o tapón de goma.
• No se mezclarán ni harán suspensiones de material infeccioso llenando y vaciando repetidas veces una pipeta.
• Los tubos agitados con vórtex se dejarán reposar durante 10 a 15 minutos para reducir al mínimo la propagación de aerosoles, especialmente si los tubos contienen altas concentraciones de bacilos tuberculosos.
• Al decantar líquidos, hay que asegurarse de que los tubos se sujetan con cierto ángulo de manera que el líquido se deslice por el lateral del tubo, o se desechará el recipiente para reducir al mínimo las posibles salpicaduras.
• Se insertará solamente la punta desechable de una micropipeta en un tubo o contenedor; NUNCA se insertará el cilindro de la micropipeta (9).

6.1.1 Operaciones dentro de la cabina de bioseguridad

• Mantener un plan regular de verificación y documentación del buen funcionamiento de la cabina.
• No utilizar el equipo si no funciona correctamente.
• Evitar la circulación de personas cerca de la cabina mientras se trabaja.
• Encender el equipo al menos 10 a 15 minutos antes de comenzar la tarea, para permitir que se establezcan los flujos de aire.
• Ubicar dentro de la cabina sólo el material necesario y en su totalidad, antes de comenzar a trabajar. Es conveniente tener escrita una lista de los materiales necesarios para verificar que nada falte.
• No introducir en la cabina formularios, ni libros, ni registros.
• Para absorber posibles salpicaduras, es conveniente cubrir el área de trabajo con una toalla de papel que será doblada y descartada dentro de un recipiente o bolsa para autoclave al finalizar el trabajo.
• No bloquear las rejillas por las que circula el aire dentro de la cabina con ningún objeto.

6.1.3 Plan de contingencia para accidentes de trabajo

• Los accidentes más graves son los que involucra rotura de tubos con cultivos positivos, por el alto número de bacilos que contienen.
• Esterilizar en autoclave los contenedores de tubos de la centrífuga cerrados si se sospecha o se comprueba alguna rotura dentro del contenedor.
• En caso de accidentes como la rotura de un tubo de cultivo positivo, evacuar a todo el personal del área al menos por una hora, para que los aerosoles sean absorbidos por el sistema de extracción de aire y las partículas más pesadas caigan, colocar papel absorbente sobre el material de accidente (o derrame) a fin de contenerlo, verter el desinfectante de uso en el laboratorio sobre papel absorbente desde el borde exterior hasta el interior en forma concéntrica. Dejar actuar el desinfectante durante al menos 30 minutos, luego recoger todo el material contaminado y colocar en un contenedor para su esterilización por autoclave. Desinfectar y limpiar el área. Utilizar el kit de derrames para controlar el accidente.
• Registrar cada accidente haciendo constar la fecha, nombres de personas involucradas y el número que identifica las muestras o cultivos que estaba manipulando. El resultado del cultivo y eventualmente de la prueba de sensibilidad correspondiente a este material permitirá orientar al médico para la decisión clínica.

6.1.4 Kit de derrame y limpieza

Ya que los accidentes de trabajo relacionados a derrames infecciosos necesitan atención y acción inmediata, es necesario tener a la mano los artículos necesarios e indispensables para hacerles frente. Idealmente, en un laboratorio que se trabaja con cepas de MTB es conveniente tener dos cajas de limpieza de derrames, uno en el exterior del área de alto riesgo biológico y otro dentro.
Los artículos indispensables que debe contener la caja de limpieza de derrames son:
Solución desinfectante que inactive micobacterias (Ver Anexo 01), respiradores N 95, guantes (01 caja), cubre zapatos, gorro quirúrgico, mandiles descartables e impermeables, papel absorbente, etanol al 70%, gafas protectoras, bolsa roja de bioseguridad y pinzas descartables.

6.2. TIPO DE MUESTRA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

6.2.1. Tipo de muestra

Se requieren muestras de esputos BK positivas y/o cultivos de MTB en medio sólido o líquido (10).
Condiciones específicas:
• Las muestras deben llegar al laboratorio acompañado de su respectiva solicitud de investigación bacteriológica.

• No utilizar mechero dentro de la cabina porque altera el flujo de aire y afecta la duración e integridad de los filtros.

• Esperar un minuto luego de introducir las manos para comenzar a operar, de manera el flujo laminar sea el óptimo.

• Operar en la zona media de la cabina.

• No dejar destapados los tubos o frascos con los que se está operando. Cerrarlos inmediatamente después de haber sacado o transferido material dentro de ellos.

• No abrir un envase o tubo conteniendo una muestra biológica sin haber cerrado antes el anterior.

• No dejar destapados una serie de envases o tubos, en ningún paso del procesamiento.

• Descartar remanentes de agua destilada, solución descontaminante o buffer utilizados para tratar una serie de muestras.

• No subir ni abrir la ventana de la cabina mientras se está trabajando.

• Si por accidente se derrama material infeccioso, mantener la cabina funcionando cubrir la superficie afectada con papel absorbente o gasa embebida en solución desinfectante de uso del laboratorio, dejar actuar durante 30 minutos y descartar todo el material dentro de un recipiente o bolsa para autoclave.

• Al finalizar la tarea dejar el equipo funcionando durante 10 a 15 minutos para purgar el aire contaminado. Descontaminar la superficie de trabajo paredes laterales y la ventana con etanol al 70% y encender lámpara UV por 10 a 15 minutos.

• Toda vez que sea necesario trasladar o mover la cabina de un lugar a otro se recomienda primero descontaminarla. Esta actividad corresponde a un equipo técnico entrenado, se recomienda programar este trabajo para un fin de semana.

6.1.2 Centrifugación

• Utilizar una centrifuga refrigerada segura y tubos de polipropileno descartables.

• Asegurar rigurosamente el equilibrio de los tubos colocados en forma opuesta dentro del rotor de la centrifuga.

• Respetar los límites de carga y velocidad de la centrifuga establecidas por el fabricante.

• Nunca abrir la centrifuga mientras está en funcionamiento.

• Abrir los contenedores de tubos de la centrifuga únicamente dentro de la cabina de bioseguridad.

• Dejar reposar los tubos al menos 5 minutos después de agitarlos con la mano, o en agitador de tubos tipo vortex, o después de centrifugarlos, antes de abrirlos.

• Eliminar muy cuidadosamente los sobrenadantes, con una maniobra suave evitando salpicaduras, en un recipiente con tapa que contenga desinfectante de uso del laboratorio.

• Las muestras enviadas al laboratorio no deben contener ningún tipo de preservante (por ejemplo, formol), caso contrario solicitar nueva muestra.
• Muestra inadecuada (muestras con rasgos de sangre (sanguinolentas), restos de alimentos, contaminada o insuficiente), informar al servicio para el nuevo envío de acuerdo al tipo de análisis.

6.2.2. Transporte de muestra

En el transporte de las muestras debe tenerse en cuenta los siguientes aspectos (11-13):
• Proteger la muestra del calor excesivo y la luz solar.
• Verificar el cierre hermético de la tapa de los envases para evitar los derrames de la muestra.
• Las muestras deben llegar al laboratorio dentro de las 24 a 72 horas en cadena de frio. Los cultivos se envían a temperatura ambiente y con sistema de triple embalaje.
• Se debe de verificar que las muestras estén bien rotuladas y coincidan con las solicitudes de investigación bacteriológica.
• Si existe un pequeño derrame del contenido, proceder a limpiar el envase con Hipoclorito de Sodio al 3% o desinfectante de uso del laboratorio.
• Evaluar la cantidad y la calidad de las muestras.

6.2.3. Conservación de muestras

La muestra de esputo, debe procesarse de inmediato después de la obtención, si no es posible procesar el mismo día, conservar en refrigeración de 2 - 8 °C. En aquellos casos que no se pudo procesar la muestra y se requiere realizar el cultivo, el tiempo entre la toma de la muestra de esputo y su procesamiento no debe ser mayor de cinco días (14,15). En caso de muestras extrapulmonares procesar dentro de las 24 horas de obtenida la muestra. En cuanto a cultivos positivos, una vez realizado la lectura, realizarde la prueba de susceptibilidad, caso contrario conservar en refrigeración.

6.3. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS

6.3.1. ENSAYO DE SONDA EN LINEA GENOTYPE MTBDRplus PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA Y/O ISONIACIDA DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

6.3.1.1. Fundamento

El ensayo de sonda en línea "Kit GenoTypeMTBDRplus v2.0", es un ensayo cualitativo in vitro utilizado para la identificación y detección de resistencia a R y/o H de micobacterias pertenecientes al CMTB. Este ensayo utiliza muestras de esputo con BK positiva, aislamientos en medio sólido (Löwenstein-Jensen, Ogawa) y aislamientos en medio líquido (BACTEC MGIT 960). Está basada en la tecnología de tiras de ADN (DNA•STRIP), en donde tiras reactivas de nitrocelulosa se encuentran recubiertas con sondas específicas de ADN, las cuales poseen secuencias complementarias a los ácidos nucleicos amplificados a partir de las muestras problemas. Luego, por un proceso altamente específico, se da lugar a la hibridación reversa entre secuencias de ADN complementarias (16). En este sentido, la identificación de la resistencia a R se da por la detección de las mutaciones más frecuentes en el gen rpoB (que codifica la 'subunidad β de la RNA polimerasa') y está determinada en la tira de nitrocelulosa por la región que contiene: una sonda de 'control de locus rpoB', ocho sondas silvestres (sondas wild type [WT]) que permiten analizar la región génica comprendida entre los codones 505 y 533, y cuatro sondas mutantes (sondas mutation [MUT]) específicas para las mutaciones de mayor prevalencia a nivel mundial D516V (rpoB MUT1), H526Y (rpoB MUT2A), H526D (rpoB MUT2B) y S531L (rpoB MUT3). Por otro lado, la determinación de la resistencia a H de alto nivel es realizada a través de la identificación de mutaciones en el gen katG(que codifica para la enzima 'catalasa peroxidasa'), y está determinada en la tira de nitrocelulosa por la región conteniendo: una sonda de 'control de locus katG', una sonda silvestre que analiza el codón 315, y dos sondas específicas para las mutaciones S315T1 (katG MUT1) y S315T2 (katG MUT2). Para la detección de resistencia a H de bajo nivel se analiza la región promotora del gen inhA (que codifica la 'NADH enoil ACP reductasa') y está determinada en la tira de membrana por la región conteniendo: una sonda de 'control de locus inhA', dos sondas silvestres, que cubren la región promotora del gen, y cuatro sondas específicas para las mutaciones no codificantes: C-15T (inhA MUT1), A-16G (inhA MUT2), T-8C (inhA MUT3A) y T-8A (inhA MUT3B) (Figura 01).

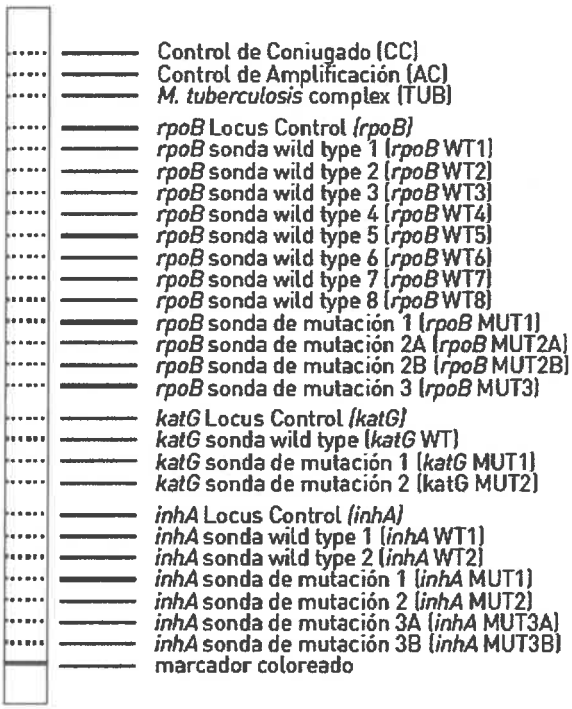


Figura01.Representación de la distribución de sondas WTyMUT de las tres regiones génicas analizadas en la tira de nitrocelulosa del kitGenoTypeMTBDR*plus*v2.0

6.3.1.2. Equipos materiales e insumos

- Equipos

- Agitador de tubos (Vortex).
- Autoclave.
- Balanza Analítica
- Baño maría
- Cabina de PCR.
- Centrífuga refrigerada con contenedor de aerosoles.
- Congeladora -20°C
- Cronómetro digital.
- CSB clase II tipo A2.
- GenoScan® (opcional)
- Microcentrífuga refrigerada digital con contenedor de aerosoles.
- Micropipeta de rango variable, 0,5 - 10 µL
- Micropipeta de rango variable, 10 - 100 µL
- Micropipeta de rango variable, 100 - 1000 µL

- Micropipeta de rango variable, 20 - 200 µL
- Mini Spin
- Potenciómetro
- Refrigeradora 4–8°C
- Termociclador / Termobloque
- Termomixer
- TwinCubator

- **Materiales**

- Bandeja de hibridación para equipo TwinCubator o equipo semiautomatizado GT-Blot 48
- Caja de acero inoxidable
- EPP correspondiente a Laboratorios de tuberculosis de riesgo moderado
- Espátulas de acero inoxidable
- Flotadores para tubos de 1.5 mL
- Gradillas para tubos de 0.2 mL
- Gradillas para tubos de 1.5 mL
- Hojas de registro (formato GenoTypeMTBDRplus v.2.0)
- Lapicero de tinta líquida
- Pinzas
- Pipetas de transferencia de 3 mL
- Pipetas serológicas de 1 y 10 mL
- Tips de 0.5 -10 µL, estéril con filtro
- Tips de 1000 µL, estéril con filtro
- Tips de 20 µL, estéril con filtro
- Tips de 200 µL, estéril con filtro
- Tubos de centrifuga de 50 mL, estéril de polipropileno (base cónica)
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL
- Tubos de microcentrífuga tapa rosca de 2 mL
- Tubos de PCR (0.2 mL) libres de DNAsa y RNAsa

- **Insumos Provistos por el kit GenoTypeMTBDRplus v2.0:**

- Conjugado concentrado (CON-C)
- Mezcla de amplificación A (AM-A)
- Mezcla de amplificación B (AM-B)
- Solución de aclarado (RIN)

- Solución de desnaturalización (DEN)
- Solución de lavado astringente (STR)
- Sustrato concentrado (SUB-C)
- Tampón de conjugado (CON-D)
- Tampón de hibridación (HYB)
- Tampón de Lisis (A-LYS)
- Tampón de Neutralización (A-NB)
- Tampón de sustrato (SUB-D)
- Tiras de nitrocelulosa con sondas de ADN impresas.

Provistos por el laboratorio:

- Agua grado molecular
- Etanol al 70%
- Citrato trisódicodihidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)
- Fosfato disódico anhidro (HNa_2PO_4)
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Hipoclorito de Sodio al 1% (preparado dentro de las 24 horas)
- N-Acetil L-Cisteina (NALC)

6.3.1.3. Cantidad y tipo de muestra

Las muestras de esputo deben tener un volumen mínimo de 3 mL. Los cultivos sólidos deben contener un mínimo de 10 colonias representativas; y los cultivos líquidos deben tener resultado positivo confirmado para MTB.

- **Condiciones previas del método:**

- Verificar que los datos de la muestra de esputo y cultivo coincidan con los datos de la Solicitud de Investigación Bacteriológica (SIB).
- Verificar en el formato de la SIB que las muestras de esputo tengan un resultado de BK positiva (1+ a 3+) y que la cantidad de muestra requerida tenga un volumen adecuado, con un tiempo de recolección no mayor a 72 horas y con un sistema de transporte que conserve la cadena de frio.
- Verificar que los cultivos positivos en medio líquido estén libres de contaminación.

- **Condiciones Previas de los reactivos del Kit Genotype MTDRplus v2.0:**

• Retirar de refrigeración (2 - 8°C) las soluciones y las tiras de nitrocelulosa del Kit GenoType MTBDRplus v2.0 a utilizar.
• Precalentar las soluciones HYB y STR a 45°C antes de usar.
• Mantener a temperatura ambiente los reactivos CON-D, SUB-D y RIN, con excepción del CON-C y el SUB-C.
• Usando un tubo de centrifuga de 50 mL, diluir CON-C y SUB-C en proporción de 1:100 en sus tampones respectivos ('CON-C diluir con CON-D' y 'SUB-C diluir con SUB-D') en las cantidades necesarias para el proceso diario. De este modo, se obtendrán soluciones diluidas del conjugado y sustrato, respectivamente. De preferencia diluir los concentrados CON-C y SUB-C antes de cada uso; asimismo, trabajar con las cantidades exactas. Mezclar bien y mantener a temperatura ambiente.

- **Interferencias y reacciones cruzadas:**

• Muestras hemoptoicas, salivales, hidrolizadas y con restos de alimentos.
• Cultivos sólidos o líquidos contaminados.

- **Fuentes potenciales de variabilidad:**

• Funcionamiento inadecuado del equipo GT-Blot 48 y TwinCubator.
• Funcionamiento inadecuado del termociclador.
• Preparación inadecuada de reactivos (CON-D y SUB-D).
• Tiempo de acción de los reactivos del kit con la tira de nitrocelulosa.
• Temperatura de incubación incorrecta.
• El HYB y/o STR no se ha precalentado o mezclado adecuadamente.
• Contaminación de ADN aislado y/o agentes de amplificación con ADN aislado y/o amplificado. - Nota: si los reactivos de amplificación están contaminados, entonces el control negativo mostrará bandas de hibridación. • Contaminación de pocillos adyacentes debido a derrame durante la adición del HYB.

6.3.1.4. PROCEDIMIENTO

Digestión e inactivación de la muestra

La digestión y descontaminación de la muestra de esputo se realiza por el método de NALC-NaOH (Anexo 02). El procedimiento se detalla a continuación:

• Colocarse el EPP correspondiente.

• Con una pipeta de transferencia tomar un volumen de 3 mL de muestra de esputo (hasta un máximo de 5 mL) y dispensarla en un tubo de centrifuga de 50 mL.

• Con una pipeta serológica de 10 mL, adicionar la 'solución de descontaminación' (para mayor detalle de esta solución, revisar el manual de cultivos) con el mismo volumen al de la muestra de esputo añadida. Ajustar las tapas y mezclar cada tubo en un vortex por 5 segundos.

- Nota: es necesario asegurarse que la muestra este completamente licuada, si en caso la muestra siga mucoide o viscosa, agregar más 'solución de descontaminación' (hasta un máximo de 2 mL más) o una pequeña cantidad de NALC en polvo, directamente al tubo, y mezclar por inversión.

• Dejar actuar a la 'solución de descontaminación' por 15 minutos a 37 °C (Baño maría o estufa) y/o temperatura ambiente.

• Transcurrido el tiempo, agregar 'Buffer fosfato' pH 6.8 (para mayor detalle de esta solución, revisar el manual de cultivos), hasta completar los 50 mL, y mezclar por inversión.

• Concentrar la muestra mediante centrifugación (15 minutos a 3000 g y a una temperatura de 10 °C), y decantar el sobrenadante.

• Resuspender el sedimento agregando 1.5 mL de 'Buffer fosfato' y agitar en un vortex por 5 segundos para finalmente obtener la muestra descontaminada.

• Realizar la siembra de la muestra descontaminada en dos tubos de medio de cultivo Löwenstein-Jensen previamente rotulados, a razón de 0.2 mL por tubo.

• Conservar el resto de muestra descontaminada a 4 - 8°C para su posterior uso en el proceso de extracción de ADN. Al finalizar, todos los materiales potencialmente infecciosos deben ser esterilizados mediante la autoclave para su posterior eliminación.

Extracción de ADN

Extracción de ADN a partir de muestras de esputos descontaminadas ycultivos líquidos

Para la extracción de ADN se utiliza el kit de extracción GenoLyse® v1.0 (Anexo 03), y se realiza Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis 20 de la siguiente manera:

• Tomar 500 µL de la muestra descontaminada de esputo y transvasar en un tubo de microcentrífuga tapa rosca de 2 mL (en caso de cultivo liquido transvasar 1000 µL).

• Concentrar las bacterias por centrifugación durante 15 minutos utilizando una microcentrífuga con contenedor de aerosoles a 10000 g o 12000 rpm.

• Eliminar el sobrenadante y adicionar 100 µL de A-LYS, tapar y agitar en un vortex x **5"**.

• Dispensar 100 µL de A-LYS en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con tapa de rosca.
• Centrifugar por 5 segundos.
• Inactivar las bacterias a 95° C por 5 min en un baño María o Termobloque.
• Centrifugar por 5 segundos.
• Agregar 100 µL de A-NB, tapar y agitar en un vórtex por 5 segundos.
• Centrifugar durante 5 minutos a 13000 g o 14000 rpm.
• Recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
• Conservar el ADN a -20°C hasta su uso.

Extracción de ADN a partir cultivo sólido

Para la extracción de ADN a partir de cultivo sólido se utiliza el kit de extracción GenoLyse® v1.0 (Anexo 03), y el procedimiento es el siguiente: • Coger con la ayuda de una espátula de siembra una masa bacteriana de colonias y adicionar a un tubo que contiene 100 µL de A-LYS.
• Agitar en vortex y centrifugar por 5 segundos. • Inactivar a 95 °C por 5 min las bacterias en un Baño María o Termobloque.
• Centrifugar por 5 segundos.
• Agregar 100 µL de A-NB, tapar y agitar en un vortex por 5 segundos.
• Centrifugar durante 5 min a 13000 g o 14000 rpm.
• Recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
• Conservar el ADN a -20°C hasta su uso.
- Nota: en todos los casos anteriores, al inicio de cada proceso de extracción se debe incluir una muestra de control negativo para la detección de una posible contaminación en la extracción de ADN.

Amplificación

Preparación de la Mezcla Maestra (Master Mix) en el área de Pre-PCR

Preparar la mezcla maestra dentro de una cabina de PCR y en un ambiente separado y libre de ADN. En este caso se utilizará el AM-A y AM-B del kit Genotype MTBDRplus v2.0 (Anexo 04).
• Retirar los tubos con solución AM-A (conteniendo Taq polimerasa, nucleótidos y buffer) y AMB (conteniendo primers biotinilados más aditivos) de la congeladora a -20 °C y dejar descongelar por lo menos 5 minutos a temperatura ambiente. • Realizar la siguiente mezcla por cada muestra:

MEZCLAMAESTRA	
Reactivo	**Volumen**
AM-A	10 µL
AM-B	35 µL
Total	45 µL

• Determinar el número de muestras de ADN a amplificar. Colocar las cantidades proporcionales de soluciones AM-A y AM-B en un tubo de 1.5 o 2.0 ml (Solución madre) y, posteriormente, dispensar volúmenes de 45 µL en tubos de PCR (0.2 mL).

- Nota: la mezcla maestra debe ser preparada fresca cada vez.

• Para el control negativo del proceso de 'Preparación de Mezcla Maestra', añadir 5 µL de agua grado molecular en uno de los tubos que contienen la Mezcla Maestra de PCR.

Cargado de ADN

Este procedimiento se realiza dentro de una cabina de PCR y en un ambiente del Laboratorio de TB libre de amplicones. Se añade 5 µL de ADN (Anexo 05) a los tubos con 45 µL de Mezcla maestra (Anexo 04), para obtener un volumen final de 50 µL. Como rutina siempre incluir controles de proceso: control negativo y control positivo.

• Tubo control negativo: Añadir 5 µL de agua grado molecular en uno de los tubos que contiene la mezcla maestra.

• Tubo control positivo: Añadir ADN de controles positivos (cepas ATCC) con perfiles de resistencia a R y H.

Perfil de Amplificación

El proceso de amplificación se realiza en el área de PCR. Se deben colocar los tubos de PCR, cargados con ADN, en el Termociclador y ejecutar el siguiente protocolo de amplificación:

Temperatura/Tiempo	Muestras de esputo	Muestras de cultivo
95°C/15min	01 Ciclo	01 Ciclo
95°C/30seg65°C/2min	20 Ciclos	20 Ciclos
95°C / 25seg50°C / 40seg70°C/40seg	30 Ciclos	20 Ciclos
70°C/08min	1 Ciclo	1 Ciclo

Los 'productos de amplificación' pueden almacenarse entre 2 a 8 °C (si se utiliza dentro de las 24 horas) y -20 °C (si se planea utilizar después de las 24 horas).

Hibridación

Este procedimiento se realiza en el laboratorio utilizando el equipo de hibridación TwinCubator o GT-Blot 48. Para llevar a cabo el proceso, se deben de seguir los siguientes pasos (Anexo 06):

• Dispensar 20 µL de DEN en la esquina inferior de cada uno de los pocillos de la bandeja de hibridación.

• Añadir 20 µL de 'productos de amplificación' y pipetear arriba-abajo para mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.

• Usando una pinza retirar las tiras de nitrocelulosa (contenidas dentro de unos tubos en el kit) y enumerarlas usando un lapicero de tinta líquida.

- Nota: en caso de realizar el procedimiento en el equipo automatizado GT-Blot 48, los pasos que se mencionan de aquí en adelante se realizarán de manera automatizada.

• Añadir cuidadosamente en la esquina superior de cada pocillo 1 mL de HYB precalentado a 45°C. Agitar suavemente la bandeja hasta que la solución tenga un color homogéneo, evitar derramar la solución en los pocillos cercanos.

• Colocar una tira en cada pocillo de la bandeja. Las tiras tienen que quedar completamente cubiertas por la solución HYB y el lado conteniendo las sondas impresas debe estar hacia arriba (identificable por el marcador coloreado próximo al extremo inferior). En caso de que la tira se voltee, volver a su posición con la ayuda de un tip.

• Colocar la bandeja en el TwinCubator durante 30 minutos a 45°C.

• Aspirar el tampón de hibridación en su totalidad empleando una pipeta de transferencia y/o tip de 1000 µL. • Añadir 1 mL de solución STR a cada tira e incubar durante 15 minutos a 45°C.

• A partir de este paso, trabajar a temperatura ambiente.

• Eliminar completamente la solución STR.

• Lavar una vez cada tira con 1 mL de solución RIN sobre la plataforma de agitación del TwinCubator durante 1 minuto y eliminarlo después de la incubación.

• Añadir 1 mL de 'Conjugado diluido' a cada tira e incubar durante 30 minutos sobre la plataforma de agitación del TwinCubator.

• Eliminar la solución y realizar dos lavados con 1 mL de solución RIN durante 1 minuto cada lavado sobre la plataforma de agitación del TwinCubator. Desechar la solución por cada lavado.

• Realizar un lavado a cada tira durante 1 minuto con 1 mL de agua destilada sobre la plataforma de agitación del TwinCubator. Desechar el agua después del lavado.

• Añadir 1 mL de 'Sustrato diluido' a cada tira e incubar en TwinCubator por 5 minutos sin agitación y protegiéndolo de la luz hasta que las bandas sean claramente visibles. En el caso de que las bandas se puedan observar antes del tiempo óptimo, detener la reacción, caso contrario dejar actuar al sustrato por no más de 10 minutos.

• Lavar las tiras dos veces con 1 mL de agua destilada y desechar totalmente el líquido.

• Retirar las tiras usando pinzas y colocarlas en papel toalla para su secado respectivo y/o dejar las tiras en la bandeja para su secado en el equipo de hibridación a una temperatura Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis 23 de 45°C.

Interpretación de resultados

Consideraciones para la interpretación de los resultados (Figura 02):

• Pegar en la hoja de registro las tiras reveladas, teniendo en cuenta la alineación de las bandas CC y AC con las respectivas líneas del formulario. Para una lectura precisa utilizar la plantilla que encontrará en cada kit, alineando separadamente para cada uno de los locus detectados, con su respectiva banda Locus Control.

• Determinar el estado de resistencia de la tira revelada y anotar los resultados en las respectivas columnas de la hoja de registro.

• Es necesario tener en cuenta durante la interpretación de las tiras los siguientes puntos que se detallan a continuación:

a. Resultado 'Complejo M. tuberculosis detectado': Resultado emitido cuando se evidencia una hibridación correcta de las sondas CC, AC y TUB. La sonda TUB hibrida con amplicones generados por todos los miembros conocidos del CMTB y es interpretada de la siguiente manera:

▪ La presencia de la banda TUB y de las bandas de sondas WT y/o MUT, de los genes rpoB, katG e inhA, determina que la muestra contiene una cepa perteneciente al CMTB.

▪ La presencia de la banda TUB y ausencia de las bandas de las sondas WT y/o MUT, de los genes rpoB, katG e inhA, determina que es necesario repetir la prueba.

▪ La ausencia de la banda TUB y presencia de las bandas de las sondas WT y/o MUT, de los genes rpoB, katG e inhA, determina que es necesario repetir la prueba.

▪ La ausencia de la banda TUB y de las bandas de las sondas WT y/o MUT, de los genes rpoB, katG e inhA, determina que la muestra no contiene una cepa perteneciente al CMTB.

b. Resultado 'Resistencia no detectada' (Sensible): resultado emitido cuando se evidencia una hibridación correcta de las sondas CC, AC, TUB, además de los siguientes casos:

• **Sensible a R:** se examina el gen rpoB.

- Cuando todas las sondas WT del gen rpoB son visibles y no se detecta la presencia de alguna mutación en las regiones MUT. Esto indica que la cepa es sensible para el respectivo antibiótico (Figura 02 – resultados: 01 y 03).

Nota: solamente serán consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que la banda de Control de Amplificación (AC). Sin embargo, la sonda rpoB WT8 constituye una excepción a esta regla, ya que, si la misma se encuentra presente, pero con una intensidad menor que la banda AC, y no se revela la banda de mutación rpoB MUT3 correspondiente, entonces dicha cepa debe ser considerada como Sensible a R.

• **Sensible a H:** se examinan los genes katG e inhA.

- Cuando todas las sondas WT de los genes katG y/o inhA son visibles y no se detecta la presencia de alguna mutación en las regiones MUT. Esto indica que Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis 24 la cepa es sensible para el respectivo antibiótico (Figura 02 – resultados 01).

c. Resultado 'Resistencia detectada' (Resistente): resultado emitido cuando se evidencia una hibridación correcta de las sondas CC, AC, TUB, además de los siguientes casos:

• **Resistente a R:** se examina el gen rpoB. - Cuando alguna de las sondas WT del gen rpoB no es visible y se detecta la presencia de una mutación en las regiones MUT. Esto indica que la cepa es resistente para el respectivo antibiótico (Figura 02 – resultados: 02 y 04).

- Cuando alguna de las sondas WT del gen rpoB no es visible y no se detecta la presencia de alguna mutación en las regiones MUT. Esto indica que la cepa es resistente para el respectivo antibiótico (Figura 02 – resultado 05).

• **Resistente a H:** se examinan los genes katG e inhA.

- Cuando alguna de las sondas WT de los genes katG y/o inhA no es visible y se detecta la presencia de alguna mutación en las regiones MUT. Esto indica que la cepa es resistente para el respectivo antibiótico (Figura 02 – resultados: 02, 03 y 04).

- Cuando alguna de las sondas WT de los genes katG y/o inhA no es visible y no se detecta la presencia de una mutación en las regiones MUT. Esto indica que la cepa es resistente para el respectivo antibiótico (Figura 02 – resultado 05).

Nota: solamente deben ser consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que las del Control de Amplificación (AC). En raras ocasiones existe la posibilidad de que la cepa analizada sea mixta es decir que en una misma muestra coexisten dos cepas, una que presenta una secuencia mutada y otra cepa con una secuencia salvaje. Entonces, puede aparecer una de las sondas MUT, así como la sonda WT correspondiente; en este caso, la cepa analizada se interpretará como resistente.

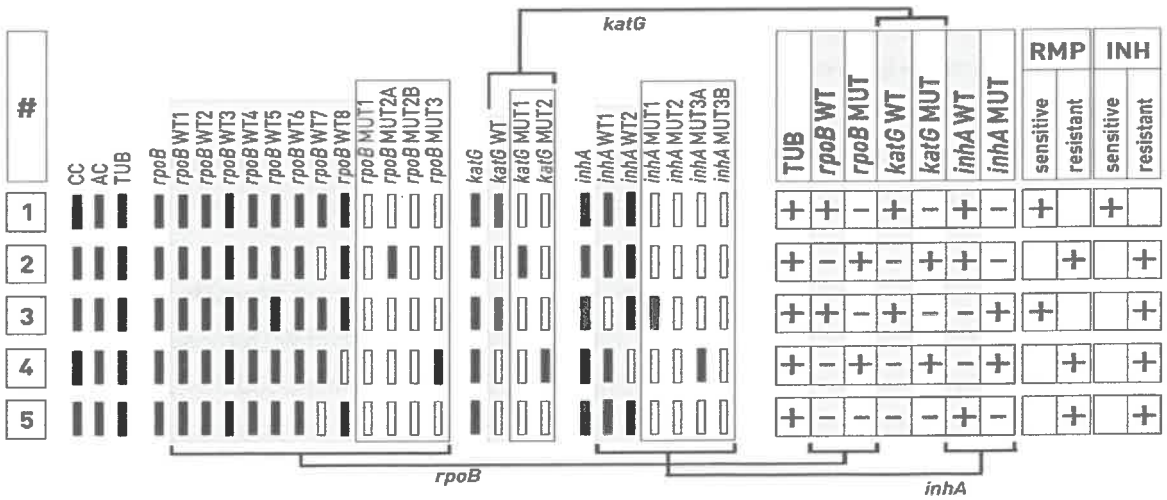


Figura 02. Interpretación de cinco resultados del ESL, kit GenoTypeMTBDRplus v2.0:

Informe de resultados

Los resultados obtenidos por este método de ensayo deben ser registrados e ingresados al sistema NETLAB por el responsable del procesamiento de las muestras, para luego ser verificado por el personal autorizado designado por el responsable del laboratorio

Limitaciones

• Esta prueba analiza la secuencia nucleotídica del ADN y no la secuencia de aminoácidos. Es posible, por tanto, que mutaciones que no causen un cambio de aminoácido (mutaciones silenciosas) podrían producir la ausencia de una de las sondas WT, y den como resultado un 'Falso resistente'.

• El GenoTypeMTBDRplus v2.0 solamente detecta aquellas resistencias del CMTB que tienen lugar en las regiones de los genes rpoB, katG e inhA examinadas aquí. Por lo tanto, mutaciones asociadas a resistencias frente a R e H que afectan otros genes o regiones intergénicas no serán detectados por esta prueba.

• Como cualquier sistema de detección basado en la hibridación, este sistema contempla la posibilidad de que variaciones de las secuencias en las regiones genómicas que fueron elegidas para los primers y sondas puedan conducir a falsos resultados. Debido a la gran variabilidad existente en los genomas bacterianos es posible que ciertos sub-tipos puedan no ser detectados. La utilización de este ensayo está limitada a personas bien entrenadas en el procedimiento de utilización del ensayo y familiarizadas con métodos de biología molecular.

6.3.2. AMPLIFICACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO EN TIEMPO REAL AUTOMATIZADO PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE Mycobacterium tuberculosis Y RESISTENCIA A LA RIFAMPICINA - XPERT® MTB/RIF

6.3.2.1. Fundamento

La OMS, en diciembre del 2010, recomendó el uso de un método genotípico denominado Xpert® MTB/RIF, el cual es una PCR-RT semianidada, cualitativa y semicuantitativa que detecta el ADN de MTB con una sensibilidad y especificidad del 88% y 99%, respectivamente. Así mismo, de manera simultánea determina la resistencia a R con una sensibilidad y especificidad del 95% y 98%, respectivamente. Este ensayo tiene una capacidad mínima de detección de 131 UFC/mL, no presenta reacción cruzada con micobacterias no tuberculosas, no requiere de un personal altamente calificado y necesita de una infraestructura similar a la de un laboratorio de baciloscopía debido a que posee un bajo riesgo de generación de aerosoles infecciosos gracias a una eficiente inactivación de las micobacterias en el proceso; además, de un corto tiempo de detección (alrededor de 2 horas) en todo el proceso (17). La resistencia a la R le confiere un importante marcador predictivo de TB-MDR ya que un 90% de las cepas

- Resultado 1: resultado sensible para R y H.
- Resultado 2: resultado resistente para R (ausencia de la WT7 y presencia de la MUT2A, en Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis 25 el gen rpoB) y resistente a H por el gen katG (ausencia de la WT y presencia de la MUT1).
- Resultado 3: resultado sensible para R y resistente a H por el gen inhA (ausencia de la WT1 y presencia de la MUT1).
- Resultado 4: resultado resistente para R (ausencia de la WT8 y presencia de la MUT3, en el gen rpoB) y resistente a H por los genes katG (ausencia de la WT y presencia de la MUT2) e inhA (ausencia de la WT2 y presencia de la MUT3A).
- Resultado 5: resultado resistente para R (ausencia de la WT7 y ausencia de todas las MUT, en el gen rpoB) y resistente a H por el gen katG (ausencia de la WT y ausencia de todas las MUT).

Anomalías:

▪ Si todas las señales son débiles (intensidad menor a la del AC) o no hay señales (incluyendo la zona de Control de Conjugado), se debe a:

- Temperatura ambiente demasiado baja o reactivos no equilibrados a temperatura ambiente, en este caso repita la prueba
- Se ha usado muy poco, o nada, de CON-C y/o SUB-C.

▪ Ausencia de señales, o señales débiles, excepto en la zona de Control de Conjugado, se debe a:

- La cantidad y/o la calidad del ADN aislado no permite una amplificación eficiente, en este caso se debe repetir la extracción de ADN.
- Las mezclas de amplificación AM-A y AM-B, han sido invertidas, añadidas en cantidades inadecuadas o mezcladas de manera inadecuada, en este caso preparar una nueva mezcla y repetir el ensayo.
- Temperatura de incubación demasiado alta. En este caso debe repetirse la hibridación reversa.

▪ Tinción no homogénea, se debe a:

- Tiras no sumergidas por completo en la bandeja de hibridación durante los pasos de incubación.
- Bandeja no agitada adecuadamente. En este caso debe repetirse la hibridación reversa.

▪ Fuerte color de fondo, se debe a:

- CON-C y/o SUB-C se han usado demasiado concentrados.
- Los pasos de lavado no fueron realizados con el cuidado necesario.
- Las soluciones de lavado no estuvieron temperadas adecuadamente, en este caso debe repetirse la hibridación reversa.

resistentes a la R también son resistentes a H y más del 95% de las mutaciones responsables de la resistencia a R ocurren dentro de una región central del gen rpoB. Además, la OMS en su revisión del 2014 menciona que una proporción epidemiológicamente significativa de cepas resistentes a R (10-13%) en pacientes con fracaso terapéutico y reincidentes no estarían siendo detectadas por las pruebas de susceptibilidad fenotípicas, de manera muy particular en el método BACTEC MGIT 960 y en menor medida en el método convencional de proporciones, debido a que estas cepas tienen un bajo grado de resistencia a la R pero que son detectados por el Xpert® MTB/RIF por estar codificadas en la porción central del gen rpoB. Finalmente, en el 2013 la OMS emite una serie de recomendaciones para el uso del Xpert® MTB/RIF (18, 19). El sistema Xpert® MTB/RIF automatiza e integra la extracción y amplificación de ácidos nucleicos, así como la detección de las secuencias diana de ADN utilizando PCR en tiempo real. El sistema consiste de un equipo GeneXpert (Anexo 08), una computadora con un software precargado para ejecutar pruebas y ver los resultados, además de cartuchos que contiene tres cebadores específicos y cinco sondas (A – E, cada una con un fluoróforo diferente) que amplifican la porción Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis 39 de 81 pares de bases del gen rpoB en donde ocurre la gran mayoría de mutaciones detectadas en cepas resistentes a R. Las sondas están diseñadas para diferenciar entre la secuencia de tipo salvaje conservada y las mutaciones asociadas con la resistencia a R. El ciclo Ct válido para las sondas A, B y C es de 39.0 y para las sondas D y E es de 36.0 establecidas para el análisis de datos MTB/RIF (20,21).

6.3.2.2. Equipos, materiales e insumos

- Equipos

- Autoclave.
- CBS II tipo A2 (opcional).
- Cronómetro digital.
- Equipo GeneXpert.
- Laptop / sistema de cómputo básico
- Lector de código de barras y códigos QR.
- Refrigeradora (4 – 8 °C).
- UPS (opcional)
- Vortex.

- Materiales

- Bolsas de bioseguridad para descarte
- EPP correspondiente a Laboratorios de tuberculosis de riesgo bajo
- Gasa o paño para limpieza de superficies
- Gradillas
- Guantes descartables sin talco

V°B° DRA. GLADYS PATIÑO SOTO

MINISTERIO DE SALUD SMIyBM V°B° MINISTERIO DE SALUD

MINISTERIO DE SALUD V°B° MINISTERIO DE SALUD

- Papel absorbente plastificado
- Papel toalla
- Pipetas de transferencia descartable de 3 mL.
- Plumón marcador
- Software GX
- Tubos de centrifuga estéril de polipropileno de 15 mL, base cónica.

- **Insumos Provistos por el kit Xpert® MTB/RIF**

- Cartucho Xpert® MTB/RIF
- Reactivo de procesamiento de muestra (SR)
- Pipeta de transferencia Xpert® MTB/RIF Provistas por el laboratorio
- Etanol al 70%
- Hipoclorito de Sodio al 1% (preparado dentro de las 24 horas)
- Solución salina / Buffer fosfato

6.3.2.3. Cantidad de muestra

El volumen mínimo requerido, de muestra de esputo, para realizar la prueba Xpert® MTB/RIF es de 3 mL (mínimo 1 mL para la prueba GeneXpert y el resto para cultivo).

6.3.2.4. Procedimiento

El procedimiento de trasvasado e inactivación de la muestra se realiza en un laboratorio de bajo riesgo. En el caso que el laboratorio cuente con una CSB podría llevarse a cabo este procedimiento en la misma.

6.3.2.4.1. Digestión e inactivación de la muestra (Anexo 08).

- Colocarse el EPP correspondiente.
- Ingresar al laboratorio.
- Limpiar la superficie del área de trabajo con etanol al 70%.
- Evaluar macroscópicamente las muestras, verificar códigos, calidad y cantidad. Registrar.
- Rotular un tubo de centrifuga de 15 mL con el código de la muestra y verificar que se encuentre correctamente etiquetado.
- Si las muestras estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases durante 20 minutos antes de comenzar a abrirlos.
- Con la ayuda de una pipeta de transferencia descartable trasladar como mínimo 1 mL de esputo al tubo de centrífuga de 15 mL.
- Adicionar un volumen duplicado de SR al tubo con la muestra (uno de muestra y dos de SR), cerrar el tubo y agitar vigorosamente de 10 a 20 veces o usar un vortex por 10 a 15 segundos.
- Incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 – 28°C).

• Agitar vigorosamente de 10 a 20 veces o usar un vortex por 10 a 15 segundos.
• Incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente (20 – 28°C). - Nota: tiempo de estabilidad del preparado es de 4 horas.

6.3.2.4.2 PCR en tiempo real (Anexo 08).

• Verificar el buen estado del cartucho Xpert® MTB/RIF sin roturas ni derrames que haga sospechar o dudar sobre la integridad del mismo.
• Rotular el cartucho Xpert® MTB/RIF con el código de la muestra correspondiente.
• Abrir la tapa del cartucho y la tapa del tubo de centrifuga cónico con la muestra digerida e inactivada.
• Utilizando la pipeta de transferencia Xpert® MTB/RIF, aspirar hasta la marca de la pipeta y, lentamente, transferir en posición vertical la muestra procesada dentro del cartucho. Luego asegurar la tapa del cartucho.
• Limpiar el exterior del cartucho con Hipoclorito de Sodio al 1% sin agitar, evitando tocar la parte posterior del mismo (zona de amplificación), el código de muestra y código QR.
• Encender equipo GeneXpert y después la computadora que contiene el programa GX.
• En el programa GX, presionar la opción 'Crear prueba', y luego completar los siguientes datos: - Identificador del paciente (nombre del paciente). - Identificador de la muestra (código de laboratorio de la muestra). - Identificador del cartucho (código QR del cartucho). - Identificador del módulo en el que se va colocar el cartucho. - Tipo de muestra. - Observaciones importantes sobre la muestra o el paciente.
• En el equipo GenXpert, abrir el módulo seleccionado (aquel señalado con la presencia de una luz intermitente), colocar el cartucho en el interior y cerrar el módulo.
• En el programa GX, seleccionar la opción 'Iniciar prueba', y esperar el tiempo necesario hasta que la prueba termine. - Nota: durante el tiempo de procesamiento de la muestra en el equipo GenXpert, puede monitorear el proceso a través de la opción 'Comprobar estado' del software GX.
• Terminado el proceso, verificar los datos, el resultado y la gráfica generada de las sondas, a través de la opción 'Ver resultados' del software GX.
• Retirar el cartucho utilizado y descartarlo en una bolsa de bioseguridad teniendo los cuidados necesarios para evitar algún derrame.
• El cartucho debe ser esterilizado mediante autoclave para su posterior eliminación.

6.3.2.4.3 Informe de resultados

Los resultados se registrarán en el sistema informático NETLAB y se realizará la verificación del mismo. Los usuarios autorizados a través de la página web del INS, pueden acceder al NETLAB, para visualizar los resultados, imprimir y entregar a su respectivo establecimiento.

6.3.2.4.4 Interpretación de resultados (Tabla 01 y Anexo 09)

RESULTADO	INTERPRETACIÓN
MTB DETECTADO: Resistencia a rifampicina DETECTADO (Anexo9.1)	La muestra contiene la secuencia objetivo para MTB: • Se ha detectado una mutación en el gen *rpoB* que está dentro del intervalo válido para 'deltadeCt' • SPC: NA (no aplicable). La señal SPC no es requerida porque la amplificación de MTB puede competir con este control. • Control de la sonda (QC1yQC2): APRUEBA. Todos los resultados de comprobación de la sonda son aceptables.
MTB DETECTADO: Resistencia a rifampicina NO DETECTADO (Anexo9.2)	La muestra contiene la secuencia objetivo para MTB: • No se detecta ninguna mutación en el gen *rpoB*. • SPC: NA (no aplicable). La señal SPC no es requerida porque la amplificación de MTB puede competir con este control. • Control de la sonda (QC1yQC2): APRUEBA. Todos los resultados de comprobación de la sonda son aceptables.
MTB DETECTADO: Resistenci a a rifampicina INDETER MINADO (Anexo9.3)	La muestra contiene la secuencia objetivo para MTB: • No se pudo determinar ninguna mutación en el gen *rpoB* debido a que la señal detectada fue insuficiente. • SPC: NA (no aplicable). La señal SPC no es requerida porque la amplificación de MTB puede competir con este control. • Control de la sonda (QC1yQC2): APRUEBA. Todos los resultados de comprobación de la sonda son aceptables.
MTB NODETECTADO: (Anexo9.4)	La secuencia objetivo para MTB no fue detectado en la muestra • SPC: APRUEBA. ELSPC cumplió los criterios de aceptación. • Control de la sonda (QC1yQC2): APRUEBA. Todos los resultados de comprobación de la sonda son aceptables.
INVÁLIDO (Anexo9.5)	La presencia o ausencia de MTB no pudo ser determinado. El SPC nocumplió con los criterios de aceptación, la muestra no fue procesadacorrectamenteoelPCRfueinhibido.Repetirlaprueba. • MTBINVÁLIDO: La presencia o ausencia de ADN de MTB no fue determinada. • SPC: NO APRUEBA. El resultado de la secuencia objetivo para MTB es negativo y el Ct del SPC no está dentro del intervalo valido. • Control de la sonda: APRUEBA. Todos los resultados de comprobación de la sonda son aceptables.
ERROR	La presencia o ausencia de MTB no pudo ser determinado. Repetir la prueba. • MTB: SIN RESULTADO • SPC: SIN RESULTADO • Comprobación de la sonda (QC1 y QC2): APRUEBA/NO APRUEBA. Lafalla en la comprobación de la sonda puede ser el origen del error, pero pueden producirse otros errores, como la falta del componente del sistema, incluso si la comprobación de la sonda aprueba.
SIN RESULTADO	La presencia o ausencia de MTB no pudo ser determinado. Repetir la prueba. 'SIN RESULTADO' significa que no se recolectaron suficientes datos. Por ejemplo, el operador detuvo la prueba cuando estaba en curso • MTB: SIN RESULTADO • SPC: SIN RESULTADO Comprobación de la sonda (QC1 y QC2): NA (no aplicable)

Tabla 01. Interpretación de resultados de la prueba molecular Xpert® MTB/RIF

6.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TUBERCULOSIS

6.4.1. ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA GENOTYPE MTBDRplus PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA Y/O ISONIACIDA DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

6.4.1.1. Control de calidad interno

• Control de Conjugado (CC): cuando el ensayo se realiza correctamente se evidencia la eficacia del conjugado (fosfatasa alcalina conjugada a la estreptavidina) unida a la biotina que al reaccionar con el sustrato se revela una banda colorimétrica. En caso no se evidencie la banda del control de conjugado es necesario repetir la prueba.

• Control de Amplificación (AC): Cuando el ensayo se realiza correctamente, un amplicón control se unirá a la zona del Control de Amplificación que al reaccionar con el sustrato se revela una banda colorimétrica, en caso no se evidencie la banda del control de conjugado es necesario repetir la prueba.

6.4.1.2. Control de calidad externo

6.4.1.2.1. Marco conceptual:

El Programa de Evaluación Externa de Calidad (EEC) es una herramienta de laboratorio que permite mejorar la calidad de los procesos a través de la investigación de las diferentes condiciones operativas para un análisis detallado, la comparación del desempeño de un laboratorio con el resto de los participantes, y de cada uno de ellos, con estándares de calidad predefinidos. Una capacitación continua para así lograr la confiabilidad de los resultados.

6.4.1.2.2. Consideraciones:

a. Laboratorios participantes: Los laboratorios participantes del control externo de la calidad, serán todos los laboratorios de referencia que realizan el ensayo de sonda en línea "Kit GenoTypeMTBDRplus v2.0", quienes serán notificados por vía telefónica o correo electrónico previa programación.

b. Periodicidad de EEC Con los laboratorios que ya han sido evaluados y que presenten una buena concordancia en los resultados de la prueba se realizará una vez al año. Se realizarán dos veces al año con los laboratorios que inician la prueba de sensibilidad, así como con los laboratorios que no han presentado buena concordancia de la prueba.

c. Conformación del panel El panel estará conformado por tres cepas de M. tuberculosis (22), procedentes del Laboratorio Supranacional OPS/OMS.

d. Preparación del panel de cepas

• Etapa pre analítica - El LNRM recibe el panel de cepas procedente del Laboratorio Supranacional OPS/OMS:

▪ 1 vial con liofilizado de MTB control en matriz de esputo (AMPLIRUN® TOTAL MTB CONTROL)

▪ 1 vial con liofilizado de MTB resistente a R en matriz de esputo (AMPLIRUN® TOTAL MTB INH RESISTANT)

▪ 1 vial con liofilizado de MTB resistente a H en matriz de esputo (AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT CONTROL)

- Preparación de paneles para cada laboratorio participante en el LNRM, codificación, etiquetado y embalaje en sistema de bioseguridad de triple empaque.

- Envío de paneles y coordinación para la recepción con los responsables de los laboratorios participantes.

- El LNRM verificará la recepción de los paneles.

e. Documentación Junto con el paquete de cepas, debe adjuntarse los instructivos para el desempaque y la nómina de los códigos de las cepas.

f. Condiciones de transporte Los tubos deben enviarse en un sistema de triple empaque de acuerdo con las normas de transporte de sustancias peligrosas de las Naciones Unidas. Los paquetes deben estar correctamente etiquetados con información del laboratorio participante.

• Etapa analítica

- El laboratorio participante, incluido el INS, efectúa el ensayo de sonda en línea para la identificación de resistencia a rifampicina y/o isoniacida del complejo MTB de acuerdo con los procedimientos técnicos del "Kit GenoTypeMTBDRplus v2.0"

- El panel contiene cepas patógenas peligrosas, por lo que se debe manipular con extremo cuidado. La manipulación de estas muestras debe ser realizada únicamente por personal entrenado aplicando procedimientos de bioseguridad adecuados.

- Los laboratorios participantes reciben las cepas enviadas por el LRNM. Estas cepas deben ser registradas en el cuaderno de registro de cada laboratorio y procesadas de acuerdo con los procedimientos técnicos del "Kit GenoTypeMTBDRplus v2.0"

- Los resultados obtenidos deben ser registrados y enviados al LRNM.

• Etapa pos analítica

- Notificación de envío de resultados Faltando una semana para cumplir la fecha límite de entrega de resultados por los laboratorios participantes, el LRNM les enviará un mensaje recordatorio, adjuntando el archivo electrónico con el formato para el envío de resultados.

- Los resultados del laboratorio participante son verificados y transcritos al formulario adjunto al instructivo de trabajo y, posteriormente, son enviados al LRNM del INS, por vía electrónica e impresa.

- Análisis estadístico de resultados Se realiza el análisis Bayesiano mediante el programa en Microsoft Excel 'Quality Control Proficiency Test', el cual permite calcular los siguientes indicadores:

▪ Sensibilidad (S): habilidad para detectar verdaderos resistentes.

▪ Especificidad (E): habilidad para detectar verdaderos sensibles.

▪ Valor predictivo positivo (VPP): relación de verdaderos resistentes del total de Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis 47 resistentes.
▪ Valor predictivo negativo (VPN): relación de verdaderos sensibles del total de sensibles. ▪ Eficiencia: relación entre el número de resultados correctos y el número total de resultados.
▪ Reproducibilidad: concordancia intralaboratorio entre cepas duplicadas
▪ Índice AC1: grado de concordancia, libre del factor del azar en relación a los resistentes del panel.
- Elaboración del informe final.

6.4.1.3. Informe individual

Este documento proporciona información sobre los resultados de los paneles y el desempeño general de los participantes en el método evaluado por el LRNM del INS. Asimismo, permite apreciar los resultados individuales de los participantes frente a los resultados de los demás laboratorios de forma confidencial, pues el laboratorio participante es el único que conoce su clave de identificación.

6.4.1.4 Informe general

Este documento proporciona información sobre el desempeño general de los laboratorios participantes en el método evaluado. Esta información es de manejo exclusivo del LRNM del INS y la ESN PCT. Esta información nos va a permitir determinar no conformidades y solicitar la implementación de acciones correctivas, las cuales deben ser verificadas por el personal del LRNM durante las supervisiones, en su aplicación y eficiencia para eliminar las causas que la originaron

6.4.1.5 Constancia de participación

Para que un laboratorio reciba una constancia de participación o evaluación, deberá haber enviado todas las respuestas dentro de los plazos establecidos. Por este motivo se recomienda asegurarse de cumplir los plazos establecidos en el cronograma de actividades. La constancia de evaluación anual no es una calificación del laboratorio en su totalidad, ni tampoco una evaluación específica del profesional que realizó el procedimiento; sino es una evaluación del desempeño del método

6.4.2 AMPLIFICACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO EN TIEMPO REAL AUTOMATIZADO PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE Mycobacterium tuberculosis Y RESISTENCIA A LA RIFAMPICINA - XPERT® MTB/RIF

6.4.2.1. Control de calidad interno

a) Control de Verificación de Sonda

• El control de verificación de la sonda es un chequeo realizado por el sistema antes de iniciar la reacción de PCR. El sistema mide la señal de fluorescencia de las sondas para monitorear:

• La rehidratación de las esferas de reactivos

• Llenado del tubo de reacción

• La integridad de la sonda y

• Estabilidad del colorante fluorescente

• Los resultados se comparan automáticamente con los ajustes de fábrica preestablecidos en el software.

• Si la sonda a comprobar falla, entonces se detiene la prueba, y se obtiene un Error como resultado.

b) Control de Procesamiento de la Muestra:

• Cada cartucho incluye un Control de procesamiento de la muestra (SPC) que contiene esporas no infecciosas en la forma de una torta de esporas secas, para verificar el procesamiento adecuado de MTB.

- Verifica que ocurrió la lisis de MTB
- Verifica si el procesamiento de la muestra fue adecuado
- Detecta inhibidores, asociados a la muestra, en la prueba de PCR en tiempo real

• SPC debe ser positivo en una muestra en que el resultado es MTB No detectado, y

• SPC puede ser negativo o positivo en una muestra donde el resultado es MTB detectado

• Si el SPC es negativo en una muestra "negativa", el resultado de la prueba es no válido.

6.4.2.2. Control de calidad externo

6.4.2.2.1. Marco conceptual:

El Programa de Evaluación Externa de Calidad (EEC) es una herramienta de laboratorio que permite mejorar la calidad de los procesos a través de la investigación de las diferentes condiciones operativas para un análisis detallado, la comparación del desempeño de un laboratorio con el resto de los participantes, y de cada uno de ellos, con estándares de calidad predefinidos. Una capacitación continua para así lograr la confiabilidad de los resultados.

6.4.2.2.2. Consideraciones:

a) Laboratorios participantes Los laboratorios participantes del control externo de la calidad, serán todos los laboratorios de referencia que realizan el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real automatizado para detección simultanea de MTB y resistencia a la rifampicina "XPERT® MTB/RIF", quienes serán notificados por vía telefónica o correo electrónico previa programación.

b) Periodicidad de EEC Con los laboratorios que ya han sido evaluados y que presenten una buena concordancia en los resultados de la prueba se realizará una vez al año. Se realizarán dos veces al año con los laboratorios que inician la prueba de sensibilidad, así como con los laboratorios que no han presentado buena concordancia de la prueba

- Sensibilidad (S): habilidad para detectar verdaderos resistentes.
- Especificidad (E): habilidad para detectar verdaderos sensibles.
- Valor predictivo positivo (VPP): relación de verdaderos resistentes del total de resistentes.
- Valor predictivo negativo (VPN): relación de verdaderos sensibles del total de sensibles. - Eficiencia: relación entre el número de resultados correctos y el número total de resultados.
- Reproducibilidad: concordancia intralaboratorio entre cepas duplicadas
- Índice AC1: grado de concordancia, libre del factor del azar en relación a los resistentes del panel.
- Elaboración del informe final.

6.4.2.3. Informe individual

Este documento proporciona información sobre los resultados de los paneles y el desempeño general de los participantes en el método evaluado por el LRNM del INS. Asimismo, permite apreciar los resultados individuales de los participantes frente a los resultados de los demás laboratorios de forma confidencial, pues el laboratorio participante es el único que conoce su clave de identificación.

6.4.2.4. Informe general

Este documento proporciona información sobre el desempeño general de los laboratorios participantes en el método evaluado. Esta información es de manejo exclusivo del LRNM del INS y la ESN PCT. Esta información nos va a permitir determinar no conformidades y solicitar la implementación de acciones correctivas, las cuales deben ser verificadas por el personal del LRNM durante las supervisiones, en su aplicación y eficiencia para eliminar las causas que la originaron.

6.4.2.5. Constancia de participación

Para que un laboratorio reciba una constancia de participación o evaluación, deberá haber enviado todas las respuestas dentro de los plazos establecidos. Por este motivo se recomienda asegurarse de cumplir los plazos establecidos en el cronograma de actividades. La constancia de evaluación anual no es una calificación del laboratorio en su totalidad, ni tampoco una evaluación específica del profesional que realizó el procedimiento; sino es una evaluación del desempeño del método

VII. RECOMENDACIONES

a) Complementar con la difusión de la presente Guía Técnica del POE de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium Tuberculosis, a los Servicios asistenciales del HNHU.

b) Elaborar directivas que permitan el cumplimiento óptimo de la presente Guía Técnica.

c) Mantener la actualización de la presente Guía Técnica, según normas establecidas.

d) Diseñar Sistema de Evaluación de Desempeño y Sistema de Estímulos al personal, en base a resultados.

c) Conformación del panel El panel estará conformado por dos cepas de MTB (25), procedentes del Laboratorio Supranacional Manual de pruebas moleculares para el diagnóstico de la Tuberculosis 53 OPS/OMS.

d) Preparación del panel de cepas

• Etapa pre analítica

- El LNRM recibe el panel de cepas procedente del Laboratorio Supranacional OPS/OMS.

▪ 1 vial con liofilizado de MTB control en matriz de esputo (AMPLIRUN® TOTAL MTB CONTROL)

▪ 1 vial con liofilizado de MTB resistente a H en matriz de esputo (AMPLIRUN® TOTAL MTB RIF RESISTANT CONTROL)

- Preparación de paneles para cada laboratorio participante en el LNRM, codificación, etiquetado y embalaje en sistema de bioseguridad de triple empaque.

- Envío de paneles y coordinación para la recepción con los responsables de los laboratorios participantes.

- El LNRM verificará la recepción de los paneles.

e) Documentación Junto con el paquete de cepas, debe adjuntarse los instructivos para el desempaque y la nómina de los códigos de las cepas.

f) Condiciones de transporte Los tubos deben enviarse en un sistema de triple empaque de acuerdo con las normas de transporte de sustancias peligrosas de las Naciones Unidas. Los paquetes deben estar correctamente etiquetados con información del laboratorio participante.

• Etapa analítica

- El laboratorio participante, incluido el INS, efectúa el ensayo de amplificación de ácidos nucleicos en tiempo real automatizado para detección simultanea de MTB y resistencia a la rifampicina de acuerdo con los procedimientos técnicos del "XPERT® MTB/RIF"

- El panel contiene cepas patógenas peligrosas, por lo que se debe manipular con extremo cuidado. La manipulación de estas muestras debe ser realizada únicamente por personal entrenado aplicando procedimientos de bioseguridad adecuados.

- Los laboratorios participantes reciben las cepas enviadas por el LRNM. Estas cepas deben ser registradas en el cuaderno de registro de cada laboratorio y procesadas de acuerdo con los procedimientos técnicos del "XPERT® MTB/RIF"

- Los resultados obtenidos deben ser registrados y enviados al LRNM.

• Etapa post analítica

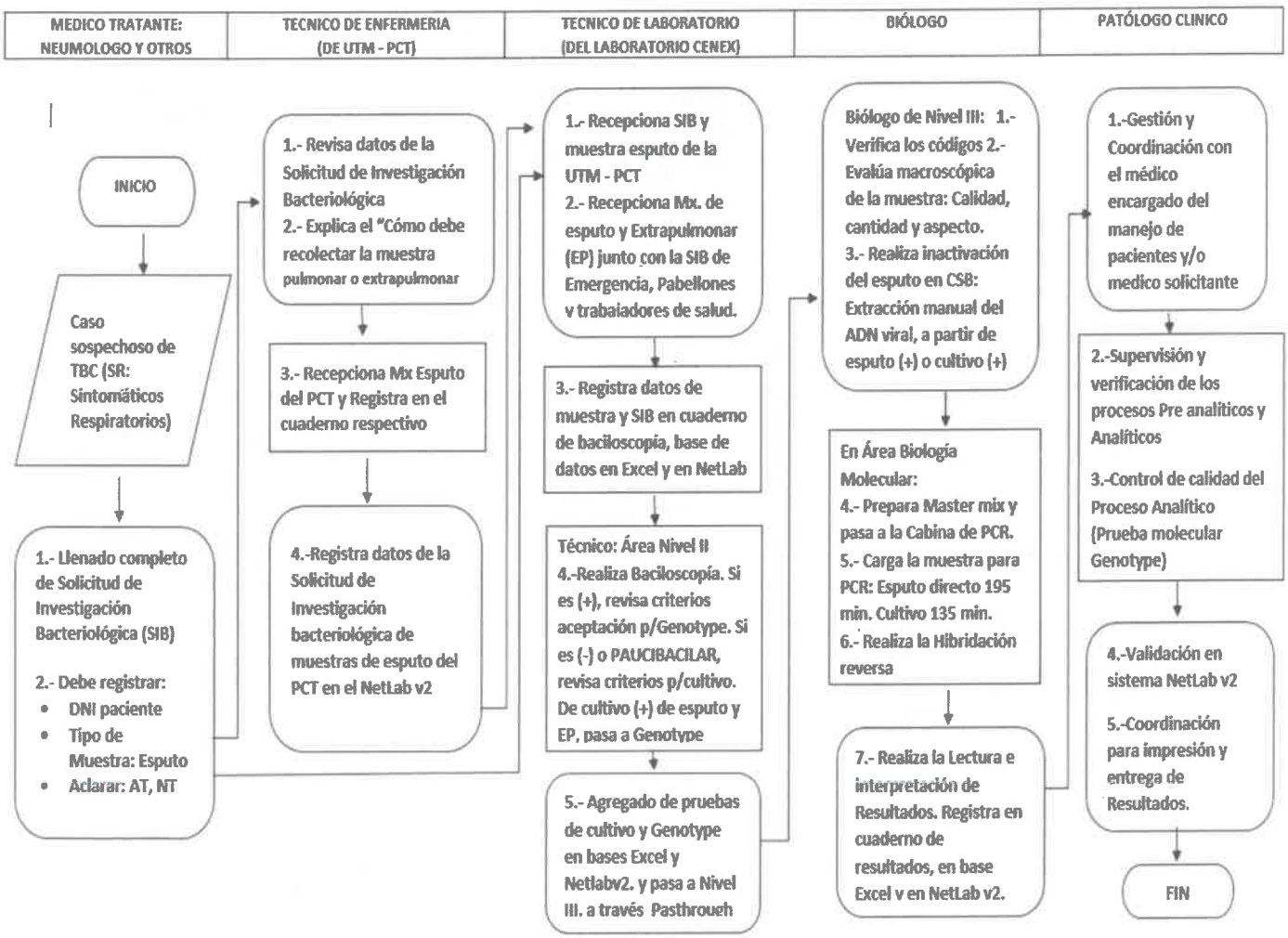
- Notificación de envío de resultados Faltando una semana para cumplir la fecha límite de entrega de resultados por los laboratorios participantes, el LRNM les enviará un mensaje recordatorio, adjuntando el archivo electrónico con el formato para el envío de resultados. - Los resultados del laboratorio participante son verificados y transcritos al formulario adjunto al instructivo de trabajo y, posteriormente, son enviados al LRNM del INS, por vía electrónica e impresa.

- Análisis estadístico de resultados Se realiza el análisis Bayesiano mediante el programa en Microsoft Excel 'Quality Control Proficiency Test', el cual permite calcular los siguientes indicadores:

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

FLUJOGRAMA DE ATENCION DE PRUEBAS MOLECULARES (GENOTYPE) DE CASOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HNHU

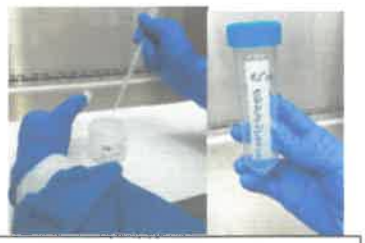


ANEXO 02

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA GenoTypeMTBDR*plus* PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE RESISTENCIA A RIFAMPICINA Y/O ISONIACIDA DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

PROCESO DE EXTRACCION DE ADN DE ESPUTO O CULTIVO (+)

1



PROCESO DE DIGESTIÓN Y DESCONTAMINACIÓN DE LA MUESTRA

2

PREPARACION DE MEZCLA MAESTRA DE PCR

3

PCR

4

Ensayo de sonda en línea GenoTypeMTBDR*plus*

HIBRIDACIÓN REVERSA DEL ESL GENOTYPE MTBDRPLUS V2.0

5

LECTURA E INTERPRETACION DE RESULTADOS DEL ENSAYO DE SONDA LINEAL GENOTYPE MTBDRPLUS V2.0

6

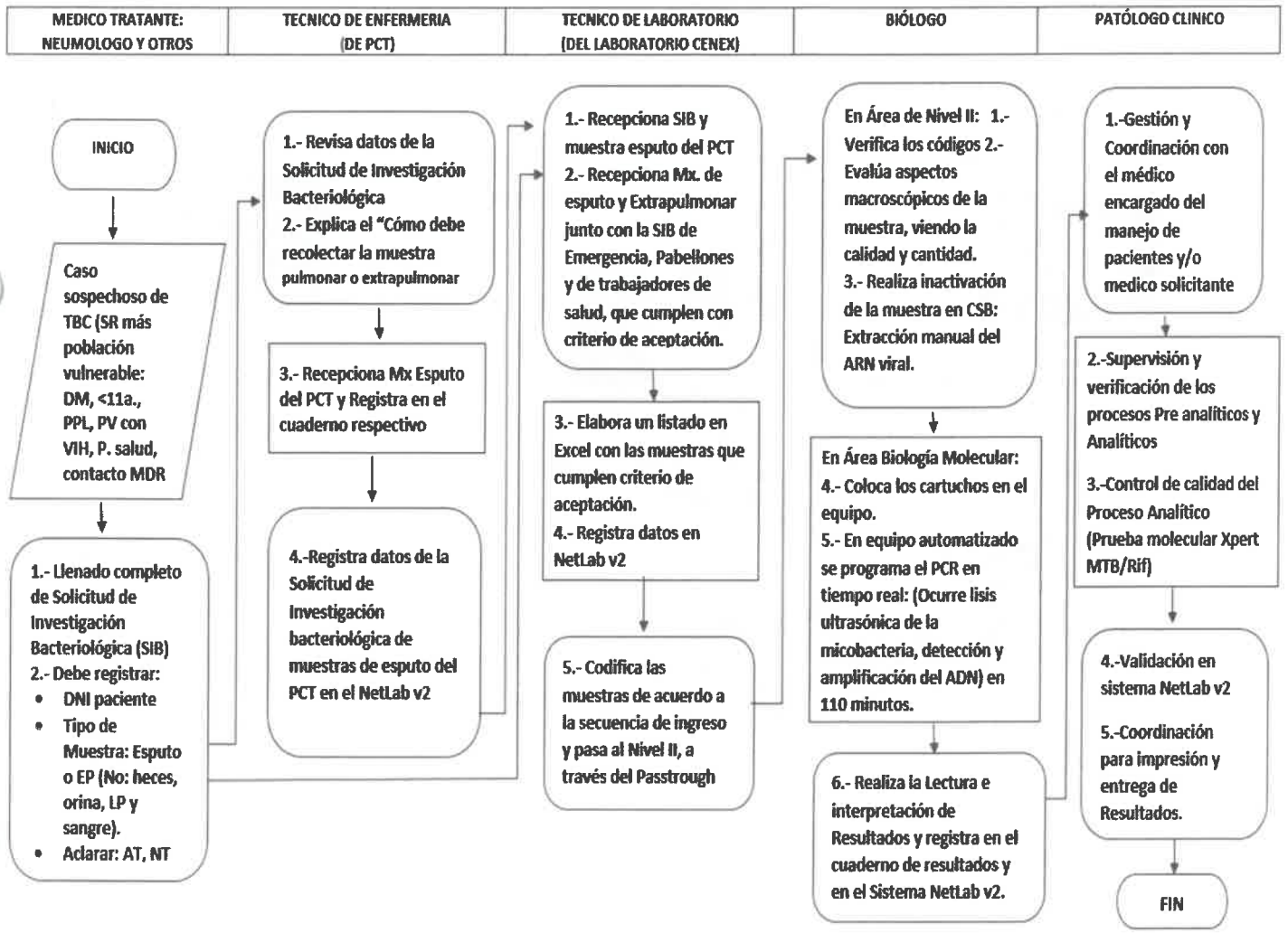
INGRESO, VERIFICACION Y VALIDACIÓN DE RESULTADOS EN EL SISTEMA NETLABv2

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR DE PRUEBAS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO Y SUSCEPTIBILIDAD DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

ANEXO 03

FLUJOGRAMA DE PRUEBA MOLECULAR (XPERT MTB/RIF) DE CASOS SOSPECHOSOS DE TBC

FLUJOGRAMA DE ATENCION DE PRUEBAS MOLECULARES (XPERT MTB/RIF) DE CASOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HNHU



ANEXO 04

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTO XPERT MTB/RIF. PARA LA DETECCION DE *Mycobacterium tuberculosis*

1 CON UNA PIPETA DE TRANSFERENCIA AGREGAR 1 ML DE MUESTRA AL TUBO DE CENTRIFUGA

2 AGREGAR AL TUBO 2 ML DE REACTIVO DE PROCESAMIENTO DE MUESTRA(SR) Y 1 ML DE MUESTRA (PROPORCIÓN 2:1)

3 AGITAR VIGOROSAMENTE DE 10 A 20 VECES O USAR UN AGITADOR. REPETIR LA ACCIÓN 2 VECES DURANTE EL PERIODO DE 15 MINUTOS

4 TRANSFERIR LA MUESTRA DIGERIDA AL CARTUCHO

5

INGRESAR LOS DATOS DEL PACIENTE EN EL SOTWARE Y DAR INICIO AL PROCESO DE PCR EN TIEMPO REAL

6

7 DESPUÉS DE 1 HORA 50 MINUTOS. INTERPRETAR LOS RESULTADOS

VERIFICACIÓN Y VALIDACIÓN DE RESULTADOS

VERIFICAR LOS CÓDIGOS Y EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA MUESTRA

ANEXO 05

DESINFECTANTES

Los desinfectantes registrados cuyo uso se recomienda en los laboratorios de tuberculosis son los que contienen fenoles, cloro o alcohol. Se seleccionan atendiendo al material que se va a desinfectar.

Desinfectante	Descripción
FENOL	El fenol debe emplearse a una concentración del 5% en agua. Lasolución de fenol se utiliza para descontaminar equipo y objetos de uso único antes de desecharlos. La inhalación y la exposición dérmica al fenol son sumamente irritante para la piel, ojos y mucosas. Debido a sutoxicidad y su olor, generalmente se utilizan derivados de fenol en lugardefenolpuro.Ej.VESPHENEal0.8%(mezcladeo-phenylphenolyp-tertiarylamylphenol).
CLORO	Las soluciones de hipocloritode sodio (lejía doméstica) contienen 50g/L de cloro disponible, por lo que deben diluirse en la proporción1:50 o 1:10 en agua para obtener concentraciones finales de 1 g/L (1%) o 5g/L (5%). La solución puede conservarse hasta tres meses; las diluciones deben prepararse cada día. La lejía puede usarse como desinfectante de uso general y para remojar material contaminado sin metales, dada su naturaleza alcalina puede corroer los metales. La ingestión accidental de pequeña cantidad de hipoclorito de sodio al3-6% puede ocasionar irritación gastrointestinal y una solución de 10% puede ocasionar lesiones corrosivas graves en la boca, garganta, esófago y estómago, la inhalación de cloro gaseoso liberado de soluciones concentradas de hipoclorito de sodio puede causar irritación de fosas nasales, garganta y el contacto con la piel causar quemaduras, inflamación y ampollas e irritación de los ojos.
ALCOHOL	Los alcoholes por ejemplo el etanol, se utiliza diluido al 70%. Son sustancias volátiles e inflamables que no deben usarse cerca de una llama. Las soluciones se almacenarán en recipientes adecuados para evitar la evaporación. Las botellas con soluciones de alcohol deben etiquetarse claramente para no introducirlas en la autoclave. La solución de alcohol al 70% se puede usar para la descontaminación de la superficie de mesas de trabajo y la Cabina de Seguridad Biológica. Una de las grandes ventajas de las soluciones acuosas de alcoholes que no deja residuo en los objetos tratados.

ANEXO 06

PROCESO DE DIGESTIÓN Y DESCONTAMINACIÓN DE LA MUESTRA

Muestra recepcionada

Coger 3 ml de muestra y agregarlo a un tubo estéril.

Agregar 3mL de solución descontaminante

Vortexear

Baño maría por 15 min

Agregar buffer hasta 50 mL

Centrifugar a 3000 rpm por 15 min

Descartar el sobrenadante

Resuspender con 1.5mL de buffer

Muestra concentrada

ANEXO 07

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Utilizar 500 µL de muestra concentrada

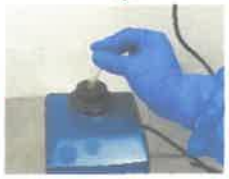
Utilizar 1mL de muestra en medio MGIT

Cultivo

Agregar a un tubo que contiene 100 µL de solución de lysis

Centrifugar 12500 rpm por 15 min

Eliminar sobrenadante y agregar 100 µL de buffer de lisis



Vortex y spin

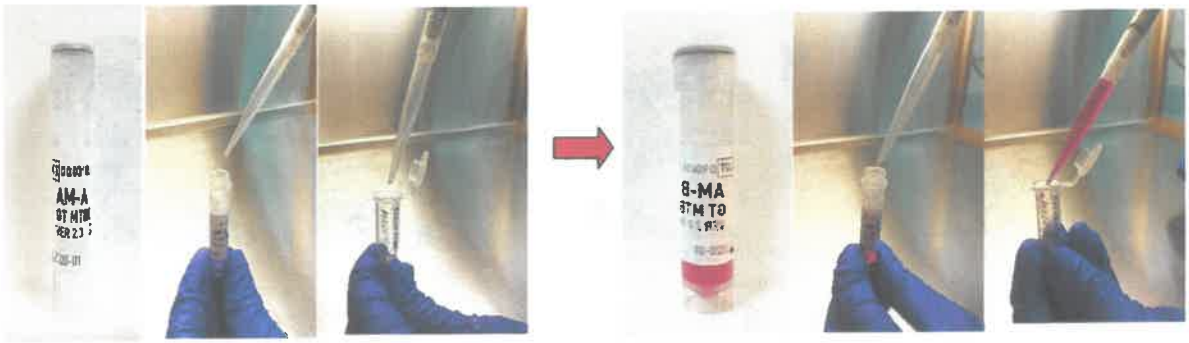
Inactivar a 95°C por 5 min (Termobloque o Baño María)

Agregar 100 µL de buffer de neutralización

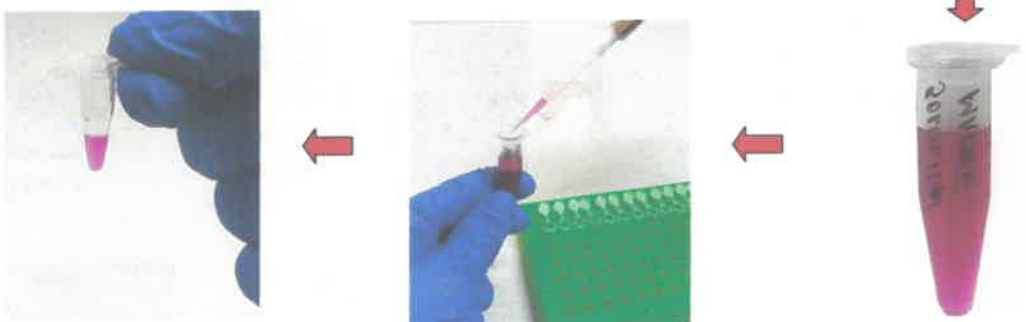
Centrifugar 14000 rpm por 5 min

ANEXO 08

PREPARACIÓN DE MEZCLA MAESTRA DE PCR (12 MUESTRAS) PARA GENOTYPE MTBDRPLUSV2.0



Mezclar 120 µL de la solución AM-A con 420 µL de la solución AM-B



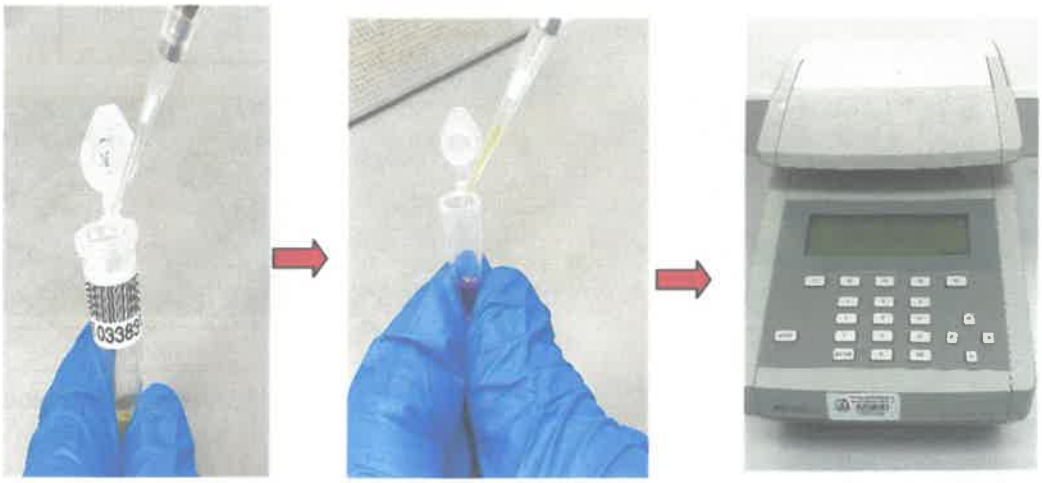
Solución madre para 12 muestras

Dispensado

Tubo PCR con 45 µL de Mix.

ANEXO 09

CARGADO DE ADN Y AMPLIFICACIÓN PARA GENOTYPE MTBDRPLUS V2.0



Agregar 5 µL de ADN al tubo de PCR con 45µL de Mix y mezclar suavemente.

Llevar a termociclador según programa (directo: esputo y cultivo)

V°B° DRA. GLADYS PATIÑO SOTO

MINISTERIO DE SALUD SMIyBM V°B° MINISTERIO DE SALUD

MINISTERIO DE SALUD CENEX V°B° MINISTERIO DE SALUD

ANEXO 10

HIBRIDACIÓN REVERSA DEL ESL GENOTYPE MTBDRPLUS V2.0

Utilizar el TwinCubator con el programa 1 de Hibridación y Detección .

1. Agregar 20 µLDEN.

2.Amplicón.

3. Agregar 20 µL del Amplicón y mezclar cuidadosamente.

4. Mezclar e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.

5. Agregar 1mL del HYB precalentado y mezclar cuidadosamente.

6. Colocar la tira DNA Strip. Incubar a 45°C por 30 minutos.

7. Incubar a 45°C por 30 minutos. Luego aspire completamente el HYB.

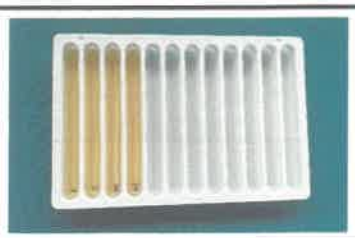
9. Incubar a 45°C por 15 minutos. Luego aspire completamente el STR.

11. Preparar: 10 µL CON-C+990µL CON-D = 1mL Conjugado diluido. Agregar 1mL al pocillo.

13. Agregar 1mL de RIN. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego eliminar completamente el RIN.

8. Agregar 1mL de SRT.

10. Agregar 1 mL de RIN. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego eliminar completamente el RIN.



12. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego eliminar completamente el conjugado.

14. Agregar 1 mL de RIN. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego eliminar completamente el RIN.

15. Agregar 1mL de agua. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego eliminar completamente el agua.

16. Preparar 10 µL SUB-C+990 Ul SUB-D=1 mL de Sustrato diluido. Agregar 1 mL.

17. Incubar a temperatura ambiente de 3 a 20 minutos. Eliminar completamente el sustrato. Luego descartar completamente el SUB.

18. Agregar 1mL para detener la reacción con dos lavados con agua.

19. Dejar secar, extraer la tira DNA*Strip de la bandeja. Realizar la lectura

ANEXO 11

PROCESO DEL ENSAYO XPERT® MTB/RIF: INACTIVACIÓN Y PCR

Se evalúa las muestras en orden para verificar los códigos de las fichas con las muestras y se procede abrir con cuidado la tapa del frasco de muestra.

1

Evaluar las muestras macroscópicamente, verificar los códigos, cantidad y calidad.

2

Rotular un tubo de centrifuga de 15 mL con el código de la muestra.

3

Con una pipeta de transferencia, agregar minimo 1 mL de muestra al tubo de centrifuga.

4

Luego agregamos al tubo con la muestra el SR en una proporcion de 2:1 (2 de DR y 1 de muestra)

5

Agitar vigorosamente de 10 a 20 veces o usar un agitador. Repetir la acción dos veces durante el periodo de 15 minutos.

6

Rotular un cartucho Xpert MTB/RIF con el código de la muestra.

7

Pasado los 15 minutos, con la pipeta de transferencia contenidad en el kit absorber la muestra digerida hasta donde indica la marca y

8

Asegurar la tapa del cartucho, desinfectado con lejía al 1 % y llevarlo al equipo GeneXpert.

9

Llenar los datos de la muestra, lote del cartucho y seleccionar el modulo a usar en el software.

10

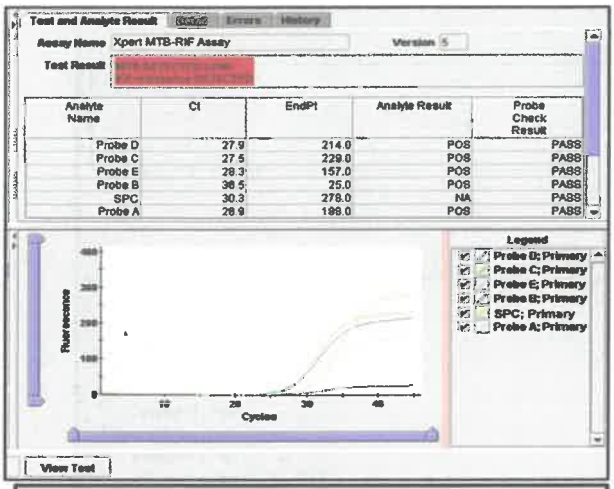
Dar inicio al proceso de PCR.

11

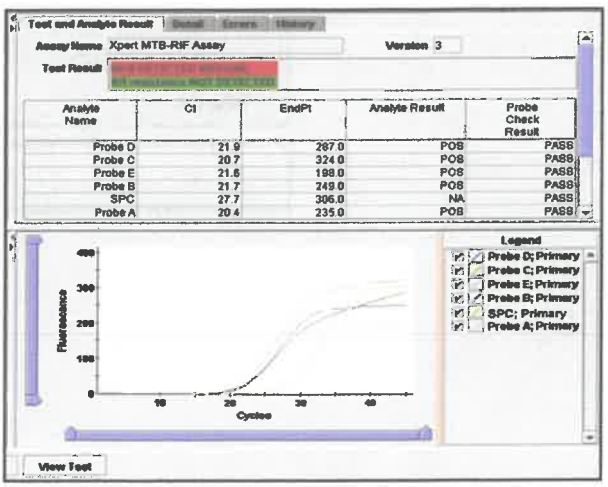
Despues de 1 h y 45 minutos, verificar el resultado del ensayo con la grafica de las sondas.

ANEXO 12

RESULTADOS DE LA PRUEBA MOLECULAR XPERT® MTB/RIF



1. Resultado MTB DETECTADO
Resistencia a rifampicina DETECTADO.

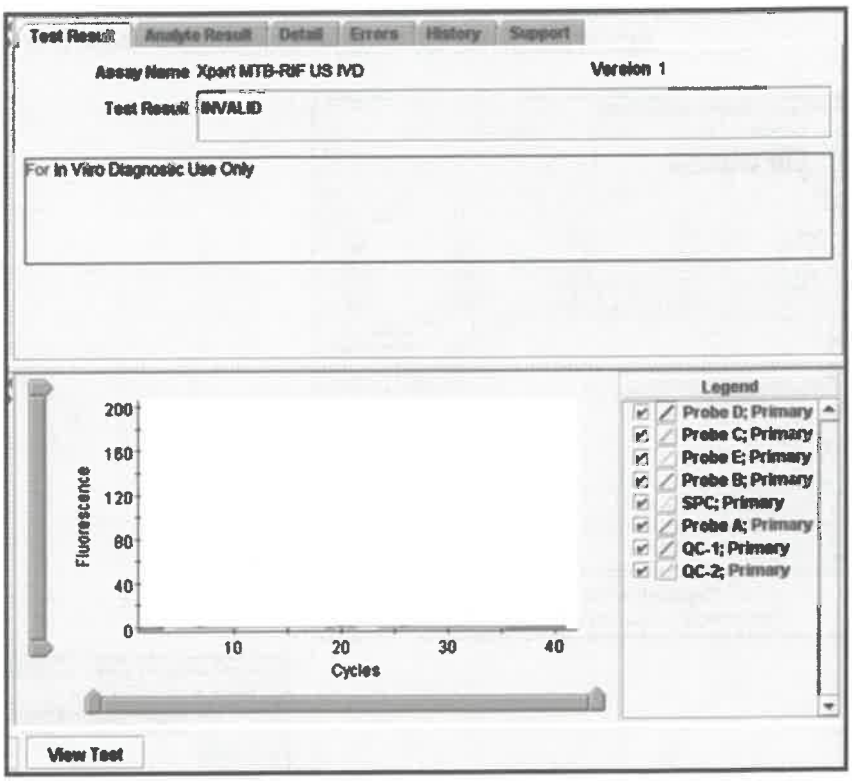


2. Resultado MTB DETECTADO
Resistencia a rifampicina NO DETECTADO.

V°B°
DRA. GLADYS PATIÑO SOTO

MINISTERIO DE SALUD
SMIyBM
V°B°
MINISTERIO DE SALUD

MINISTERIO DE SALUD
CENEX
LABORATORIO DE MICOBACTERIAS
V°B°
MINISTERIO DE SALUD



5. Resultado INVALIDO.

IX. Bibliografia

1. EXT-CNSP-202: Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Norma y guía técnica. Parte I. Baciloscopias. 2008. OPS.

2. Patricia García, M. Elvira Balcells, Claudia Castillo CM, Enrique Geoffroy JCR y AW. Evaluación de la técnica Xpert® MTB/RIF para la detección de Mycobacterium tuberculosis complex en muestras extra-pulmonares. Rev Chil Infectol. 2017;34(4):333–9

3. Bacteriología de la Tuberculosis. Nota Técnica N-28 OPS/OMS, Nros. 26, 27, 28 y 29 Ed. CEPANZO (OPS/OMS.B.Aires, 1988).

4. Ernest Jawest, Joseph Melnich. MICROBIOLOGIA MEDICA. México, 1991.

5. Resolución Ministerial N° 715-2013/MINSA que aprueba la NTS N° 104 – MINSA/DGSP-V. 01 "Norma técnica de salud para la Atención Integral de las Personas Afectadas por Tuberculosis".

6. Resolución Ministerial N°895-2018/MINSA que aprueba la NTS N°143-2018/MINSA/DGIESP "Norma técnica de salud para la prevención y control de la coinfección de la tuberculosis y virus de la inmunodeficiencia humana en el Perú"

7. Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos Serie de Normas Técnicas Nº 18 Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud.

8. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos Bioseguridad en los Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos. Serie de Normas Técnicas INS 2005. Norma Técnica Nº 18.

9. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el laboratorio de Tuberculosis". 2013. ISBN 978 92 4 350463 6

10. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I) 2ª Ed. Lima: INS, 1997. Serie de Normas Técnicas Nº 15.

11. Instrucciones técnicas para la seguridad en el transporte aéreo de mercancías peligrosas de la Organización Internacional de Aviación Civil (ICAO). Montreal: Asociación Internacional de Transporte Aéreo: IATA-DGR, 2002

12. WHO/HSE/EPR/2008.10. Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas 2009–2010

13. WHO/CDS/CSRL/LYO/2004.9. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2009–2010. Acceso 10 de noviembre de 2010.

14. Normas de seguridad en el almacenamiento, transporte y envío de material biológico. Núria Borrell Xavier Mesquida Pedro Alomar 17.9. Acceso 21 de noviembre 2010.

15. Normas técnicas para el almacenamiento y respaldo de la información que se procesan en las entidades del estado. Acceso 26 de noviembre de 2010.

16. Luis Asencios, Marco Galarza, Neyda Quispe, Lucy Vásquez, Elena Leo, Eddy Valencia, Juan Ramírez, Margoth Acurio, Rosario Salazar. Prueba molecular Genotype® MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. RevPeruMedExp Salud Pública. 2012; 29(1):92-98.

17. EXT-CNSP-532: Xpert MTB/RIF implementation manual Technical and operational 'how-to': practical considerations. 2014. WHO.

18. EXT-CNSP-533: Ameeta S. Kalokhe, MajidShafiq, James C. Lee, Susan M. Ray, Yun F. Wang, Beverly Metchock, Albert M. Anderson y Minh Ly T. Nguyen. Multidrug-resistant tuberculosis drug susceptibility and molecular diagnostic testing: a review of the literature. Am J MedSci. 2013; 345(2)

19. EXT-CNSP-534: Xpert MTB/RIF assay. 2015. Cepheid.

20. EXT-CNSP-536: Xpert MTB/RIF Training Package. Global Laboratory Initiative.

21. EXT-CNSP-537: Evaluation of Xpert MTB/RIF forDetection of Tuberculosis from Blood Samples of HIV-Infected Adults Confirms Mycobacterium tuberculosis Bacteremia as an Indicator of Poor Prognosis. Nicholas A. Feasey, Padmapriya P. Banada, William Howson, Derek J. Sloan, Aaron Mdolo, Catharina Boehme, Geoffrey A. Chipungu, Theresa J. Allain, Robert S. Heyderman, Elizabeth L. Corbett, and David Alland. 2013

22. Devonshire AS, O'Sullivan DM, Honeyborne I, Jones G,,Huggett JF. The use of digital PCR to improve the application of quantitative molecular diagnostic methods for tuberculosis. BMC Infect Dis. 2016 Aug3;16:366

23. Manual de procedimientos de Baciloscopía para el diagnóstico de Tuberculosis. Instituto Nacional de Salud (INS). Centro Nacional de Salud Pública. Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias. 2019

ACTA DE REUNION EXTRAORDINARIA DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGIA, INMUNOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR (DPTO DE PATOLOGIA CLINICA Y ANTOMIA PATOLOGICA) CON PERSONAL PROFESIONAL DEL AREA DE LABORATORIO DE MICOBACTERIAS Y BIOLOGIA MOLECULAR

Siendo las 8:30 horas del día 30 de Enero del 2021, se da inicio a la reunión convocada por la Jefa del Servicio de Microbiología, Inmunología y Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, con la presencia del personal profesional del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular (Laboratorio del Cenex del HNHU):

AGENDA:

1.- Revisar la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium tuberculosis, elaborado con la participación del personal del Laboratorio de Micobacterias y Biología molecular que realiza las pruebas moleculares para Diagnóstico de Tuberculosis y emitir Opinión en relación al documento mencionado.

2.- Acordar fecha de inicio de aplicación en el Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular (Laboratorio del Cenex) del Hospital Nacional Hipólito Unanue, de la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium tuberculosis.

ACUERDOS:

1.- Luego de la revisión de la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium tuberculosis, elaborado por el personal del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular (Laboratorio del Cenex) del Hospital Nacional Hipólito Unanue, que interviene en el procesamiento de los procedimientos incluidos en esta Guía Técnica y estando de acuerdo en forma unánime, emiten **OPINION FAVORABLE**, para todos los ítems considerados en el presente documento.

2.- Se acuerda que la presente Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Pruebas Moleculares para Diagnóstico y Susceptibilidad del Complejo Mycobacterium tuberculosis será aplicado en el Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular (Laboratorio del Cenex) del Hospital Nacional Hipólito Unanue, **desde el 1ro de Febrero del 2021.**

Sin más acuerdos, finaliza la reunión a la 11:00 am, y firman en señal de conformidad:

NOMBRE	PROFESIÓN	FIRMA
M.C: Elizett Blanca Sierra Chávez	Médico Patólogo Clínico-Jefa del Servicio	
M.C: Rosa Vilma Acurio Usca	Médico Patólogo Clínico-Asistente	
M.C: Mirella Zegarra Moreno	Médico Patólogo Clínico-Asistente	
Marilú Jesús Farfán Salazar	Biólogo	
Sylvia Denisse Gutiérrez Asin	Biólogo	
Víctor de la Cruz Grimaldo	Biólogo	
Jesús Gabriel Basurto Bustos	Biólogo	
Melissa Carrascal Huyhua	Biólogo	

HOSPITAL NACIONAL "HIPÓLITO UNANUE" Departamento de Patología Clínica Anatomía Patológica V°B° DRA. GLADYS PATIÑO SOTO

MINISTERIO DE SALUD SMIyBM V°B° MINISTERIO DE SALUD

MINISTERIO DE SALUD CENEX V°B° MINISTERIO DE SALUD