



Resolución Directoral

Lima 24 de octubre de 2022

Visto el Expediente Nº 22-030318-001, que contiene el Memorando Nº 1522-2022-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 Cultivos para Diagnóstico de Tuberculosis", mediante acto resolutivo;

CONSIDERANDO:

Que, los numerales I y II del Título Preliminar de la Ley Nº 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 76º y 79º 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 la 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, mediante 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, describe 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, el Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, según el literal j) del artículo 75º del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Hipólito Unanue, tiene dentro de sus funciones generales: "Proponer y aplicar los procedimientos y guías de atención para la atención de los pacientes en la Institución", motivo por el cual la propuesta presentada;

Que, la Oficina de Gestión de la Calidad, según el artículo 11° del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Nacional Hipólito Unanue, es la unidad orgánica que se encarga de implementar el Sistema de Gestión de la Calidad en el Hospital para promover la mejora continua de la atención asistencial y administrativa al paciente con la participación activa del personal y en el literal f) del mencionado artículo señala que dentro de sus funciones generales se encuentra: Asesorar en la formulación de normas, guías de atención y procedimientos de atención al paciente;

Que, es por ello, que con Nota Informativa N° 348-2022-OGC/HNHU, adjunta el Informe N° 321-2022-KMGH/HNHU, en el cual se concluye que el proyecto de la "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Cultivos para Diagnóstico de Tuberculosis", elaborado por el Servicio de Microbiología, Inmunología y Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, ha sido evaluado y se encuentra acorde de manera estructural a los lineamientos planteados en el documento "Normas para la Elaboración de documentos Normativos del Ministerio de Salud" aprobado mediante Resolución Ministerial N° 826-2021/MINSA, precisando además con Memorando N° 664-2022-OGC/HNHU que :el documento "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Cultivos para Diagnóstico de 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;

Estando a lo informado por la Oficina de Asesoría Jurídica en su Informe N° 452-2022-OAJ/HNHU;

Con el visto bueno del Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica, de la Oficina de Gestión de la Calidad y de la Oficina de Asesoría Jurídica; y, de conformidad con lo dispuesto por la Ley N° 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 N° 099-2012/MINSA;

SE RESUELVE:

Artículo 1.- APROBAR la "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Cultivos para Diagnóstico de Tuberculosis", 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 Técnica 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 <https://www.gob.pe/hnhu>.

Regístrese y comuníquese.

MINISTERIO DE SALUD
Hospital Nacional Hipólito Unanue
Dr. Andrés Martín ALCANTARA DÍAZ
Director General (e)
CMP N° 028813

AMAD/EVV/J/snn
DISTRIBUCIÓN:
() D. Adjunta
() Dpto. de Patología Clínica y Anatomía Patológica
() OAJ
() Of. Gestión de la Calidad
() OCI
() Comunicaciones
() Archivo



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

I. FINALIDAD

La tuberculosis (TB) es en la actualidad la enfermedad infectocontagiosa que más muertes causa al año a nivel global, por encima del VIH/SIDA. En el último reporte global de la TB emitido por la Organización Mundial de la Salud se estima que, en el 2017, se diagnosticaron 10,0 millones de personas y 136 millones de personas murieron en todo el mundo. Esta enfermedad ataca preferentemente a los pulmones, pero puede afectar también a otros órganos del cuerpo humano. El diagnóstico se realiza por medio de la observación microscópica en un frotis del bacilo teñido (Baciloscopia) o mediante el aislamiento de la bacteria al realizar cultivos a partir de una muestra clínica (1).

Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar.

Si se considera el total de casos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmado bacteriológicamente, la baciloscopia detecta el 70-80% y el cultivo 20-30% el restante. Estas cifras están condicionadas por la situación epidemiológica. (2)

El cultivo sirve para complementar el diagnóstico de TB. En los casos de TB diagnosticada por bacteriología. Debido a que detecta únicamente bacilos vivos, es el método ideal para demostrar curación. También permite demostrar sensibilidad a antibióticos.

Finalmente, el cultivo es el método de referencia (Estándar de Oro) con el que se evalúa todos los métodos nuevos de diagnóstico de MTB.

En este sentido, el cultivo es útil para:

- El diagnóstico diferencial de TB pulmonar de sintomáticos respiratorios con dos ba baciloscopías negativas y cuadro clínico-radiológico sugestivo de TB.
- Diagnóstico de tuberculosis infantil.
- Diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar.
- Muestras de pacientes con antecedentes de tratamiento, abandono o fracaso.
- Pacientes VIH positivos.
- Muestras paucibacilares de BK.
- Contactos de casos con TB resistente, trabajadores de salud o de prisiones.
- Estudios epidemiológicos de resistencia primaria y secundaria de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Pacientes multitratados con persistencia de baciloscopia positiva.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

Sin embargo, dentro de las desventajas relacionadas al cultivo, se tiene que la prueba no se realiza en todos los Establecimientos de salud (EESS) y además existe el problema técnico de la obtención de la muestra para el cultivo cuando el tratamiento evoluciona favorablemente y el paciente ya no tiene expectoración. (3)

El cultivo, permite aislar a la micobacteria para realizar la prueba de sensibilidad a los medicamentos antituberculosos e identificar a los pacientes que necesitan una reformulación de la quimioterapia con un nuevo esquema de tratamiento.

El procesamiento de muestras clínicas con sospecha de TB involucra agitación con la generación de aerosoles peligrosos, lo que incrementa el riesgo para el analista y por lo tanto, el laboratorio debe introducir medidas adicionales de bioseguridad para los analistas como es el uso del equipo de protección personal (EPP) (4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda al menos un laboratorio de CULTIVO para una población de 500 000 habitantes; por lo que es conveniente fortalecer la infraestructura y el equipamiento de los laboratorios, a fin de descentralizar el cultivo.

El cultivo permite mejorar la evaluación de la eficiencia del Programa en la administración de tratamientos, optimizar el manejo de la tuberculosis multirresistente y la asociada a HIV, y progresar en el control de la enfermedad donde se han alcanzado los objetivos establecidos para los casos infecciosos.

El análisis de la situación también conduce a impulsar la garantía de calidad del cultivo y asegurar el acceso a esta técnica de los pacientes que pueden beneficiarse con ella.

Por todo lo anterior, es necesario elaborar la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estandar de Cultivos para Diagnóstico de Tuberculosis del HNHU, con la finalidad de contar con Documentos actualizados en cumplimiento de las normas para la identificación *Mycobacterium tuberculosis* mediante CULTIVO, aclarando que previamente se ha asegurado la competencia, calidad y bioseguridad de realización de Baciloscopías (2)

II. OBJETIVO

El objetivo de esta guía técnica del Procedimiento Operativo estándar de Cultivos para el Diagnóstico de Tuberculosis, es estandarizar los procedimientos técnicos de Cultivos para el diagnóstico de la tuberculosis, 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





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

III. ÁMBITO DE APLICACION

La presente Guía Técnica de Procedimiento Operativo Estándar de Cultivos para el Diagnóstico de Tuberculosis, deberá ser aplicado en el Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular del Hospital Nacional Hipólito Unanue, considerando que este personal: Profesional Biólogo, Tecnólogo médico y técnico de laboratorio del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular, cuenta con capacitación y Evaluación permanente por parte del INS.

IV. NOMBRE DEL PROCESO A ESTANDARIZAR

CODIGO CPT: 87116 (Cultivo de bacilos de tubérculo o cualquier otro bacilo acido-resistente , p.ej. tuberculosis, AFB, micobacteria; Cualquier fuente, con aislamiento e identificación presuntiva de aislamientos).

CODIGO CPT: 87117 (Cultivo de bacilos de tubérculo o cualquier otro bacilo acido-resistente , p.ej. tuberculosis, AFB, micobacteria; concentración más aislamiento).

En la presente "Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Cultivos para el Diagnóstico de Tuberculosis del Hospital Nacional Hipólito Unanue" se describen los procedimientos que corresponden al - **Código CPT: 87116** para Bk Cultivo por método **OGAWA** y Bk Cultivo por método **LOWENSTEIN JENSEN** y al - **Código CPT: 87117** para Bk Cultivo Automatizado **BACTEC MGIT 960**.

V. CONSIDERACIONES GENERALES

El Bacilo de la Tuberculosis y Otras Micobacterias en Muestras Clínicas

El orden de los Actinomycetales incluye las familias Mycobacteriaceae, Actinomycetaceae, Streptomycetaceae y Nocardiaceae. La familia Mycobacteriaceae contiene un solo género, el género *Mycobacterium*, que en sus orígenes sólo se conocían dos especies: El bacilo de la lepra o *Mycobacterium leprae* y el bacilo tuberculoso o *Mycobacterium tuberculosis*.

Dentro del género *Mycobacterium* se han descrito más de 120 especies de micobacterias. Las micobacterias se caracterizan por ser bacilos ácido-alcohol resistente debido al alto contenido de lípidos que tienen en su pared celular. Este hecho impide que penetren los colorantes habituales de anilina, por lo que no se pueden ver en la tinción de Gram, y para poder visualizarlas son necesarios





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

colorantes especiales (arilmetanos), pero que una vez teñidos no se decoloran con una mezcla de alcohol y ácido.

Las micobacterias son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos, siempre que estén protegidas de la luz solar, y además, son más resistentes a los ácidos, álcalis y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Son resistentes a la desecación y a la congelación, pero la luz ultravioleta y el calor (>65° C durante 30 minutos) las inactiva (5).

5.1 Definiciones operativas

Tuberculosis: Es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* y casi siempre afecta a los pulmones, entre el 80-85% de casos diagnosticados. Sin embargo, la TB puede manifestarse en cualquier órgano ya que el bacilo tiene la capacidad de diseminarse por todo el organismo.

Muestra biológica: Cualquier material biológico de origen humano: sangre y sus derivados, tejidos u órganos y sus remanentes.

Tuberculosis Pulmonar: Persona a quien se le diagnostica con Tuberculosis con compromiso del parénquima pulmonar con o sin confirmación bacteriológica.

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

Mycobacterium tuberculosis. Es una bacteria que requiere técnicas especiales de tinción y medios de cultivo distintos a los empleados habitualmente en bacteriología. Además, para poder aislarla, y debido a su crecimiento lento, es necesario realizar una descontaminación previa de las muestras con el fin de eliminar la flora acompañante que crece más rápidamente. En condiciones favorables *M. tuberculosis* se divide cada 18 a 20 horas (2).

Complejo *Mycobacterium tuberculosis.* Está compuesto por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. microti* y *M. pinnipedi*. En general, la proporción de casos de TB humana causada por *M. bovis* es baja en comparación con *M. tuberculosis* (6). Desde el punto de vista de la salud pública, *M. tuberculosis* y *M. africanum* son las especies de micobacterias más importantes, porque son altamente patógenas para el hombre y muy transmisibles de individuo a individuo a través de aerosoles expulsados por la tos de los pacientes con lesión pulmonar. *M. africanum* es patógeno frecuente en el continente africano, aunque su dispersión en otras áreas geográficas es posible a través de las corrientes migratorias.

Mycobacterium No Tuberculosis. Este grupo heterogéneo de micobacterias ha recibido otros nombres como: micobacterias atípicas, otras micobacterias diferentes a tuberculosis (MOTT), micobacterias ambientales o micobacterias oportunistas. Inicialmente, la nomenclatura de estas especies se realizó atendiendo a su poder patógeno para las distintas especies animales como *M.*





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

simiae o *M. avium*. Posteriormente se fueron aislando otras micobacterias a partir de muestras ambientales (aguas, suelo, polvo, etc.) (5).

Mycobacterium avium. Tienen baja patogenicidad y conocer el verdadero significado clínico de su aislamiento a partir de muestras respiratorias suele ser muy difícil. Cuando se aíslan repetidamente ante cuadros clínicos similares a TB y no se encuentran otros patógenos, puede ser que tengan significación clínica. Esta especie ha sido reportada como una de las formas más frecuentes en pacientes con VIH / SIDA que tienen un recuento de CD4 inferiores a 50 / mm³, dando lugar a un cuadro diseminado (aislamientos en hemocultivos) que podría afectar a cualquier órgano (5).

Mycobacterium kansasii. Es una de las especies que se aísla con más frecuencia en casos de micobacteriosis. Produce cuadros clínicos semejantes a la tuberculosis y su aislamiento a partir de muestras respiratorias casi siempre suele tener significado clínico. Pese a ello, antes de atribuirle un significado clínico definitivo se debe procurar su aislamiento repetido, al igual que ocurre con todas las Micobacterias no tuberculosas. Su morfología en la baciloscopia suele ser característica (5).

Mycobacterium gordonae. Se aísla con frecuencia, pero no suele tener significado clínico. Hay muy pocos casos documentados de enfermedad producida por *M. gordonae*. En cuanto al resto de micobacterias, hay algunas a las que se atribuyen cuadros clínicos específicos, como las infecciones de piel debidas a *M. marinum* y *M. ulcerans* (causante este último de la úlcera de Buruli), y otras que precisan enriquecimientos especiales de los medios de cultivo para poder crecer (*Mycobacterium haemophilum* y *Mycobacterium genavense*). Entre micobacterias de rápido crecimiento tenemos *M. fortuitum*, *M. abscessus* y *M. chelonae*.

5.2 Siglas:

BAAR: Bacilo Ácido Alcohol Resistente

BK: Bacilo de Koch

BHI: Infusión cerebro corazón.

CSB: Cabina de seguridad biológica.

EPP: Equipo de protección personal.

EESS: Establecimiento de salud.

INS: Instituto nacional de salud

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LRR: Laboratorio de referencia regional

LRNM: Laboratorio de referencia nacional de micobacterias

MGIT: Tubo indicador de crecimiento micobacteriano

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MTC: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

NALC: N-acetil L-cisteína.

NaOH: Hidróxido de sodio

NSB 2: Nivel de bioseguridad 2.

OADC: Suplemento de enriquecimiento (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa).

OMS: Organización Mundial de la salud

PANTA: Mezcla liofilizada de antibióticos (polimixina B, amfotericina B, ácido nalidixico, trimetoprim y azlocilina).

PBS: Buffer fosfato

RNLSP: Red nacional de laboratorios de salud pública

SR: Sintomático respiratorio

TB: Tuberculosis

VIH: Virus de la inmunodeficiencia adquirida

(8)

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 servicios de salud, vinculadas a accidentes por exposición a muestras biológicas cuando se realizan pruebas de diagnóstico de tuberculosis. Las medidas de bioseguridad involucran a todos los miembros del equipo tanto asistencial como administrativo, a fin de disminuir o eliminar todo riesgo de contagio de la enfermedad.

El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico bacteriológico debe cumplir las medidas de bioseguridad establecidas en el Manual de Normas de Bioseguridad (Serie de Normas Técnicas N° 18), elaborado por el Instituto Nacional de Salud (7).

6.1.1. Aspecto de bioseguridad

- Las prácticas microbiológicas estándar y las prácticas especiales deben ser siempre rigurosamente cumplidas.
- Toda muestra que ingresa al Laboratorio para su proceso debe ser considerada como potencialmente infecciosa para MTB.
- Todos los procedimientos que incluyen la manipulación de materiales infecciosos de riesgo alto deben ser desarrollados dentro de la CSB.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- Las puertas y ventanas del laboratorio han de permanecer siempre cerradas, con acceso restringido solo para personal autorizado.
- Los analistas deben usar equipos de protección personal (respiradores N95, mandiles, mandilones, doble guante, cubre zapatos, gorro quirúrgico).
- Todos los procedimientos deben ser realizados cuidadosamente, con el objetivo de minimizar la producción de aerosoles.
- Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas diariamente, antes y después de terminar el trabajo, utilizando el desinfectante de uso del laboratorio, el cual garantice la eliminación o inactivación de micobacterias. (ver Anexo 01).
- En caso de derrame de material peligroso sobre las superficies de trabajo, deben ser descontaminadas inmediatamente con la solución desinfectante de uso del laboratorio, de acuerdo con el procedimiento interno de bioseguridad y limpieza.
- Todos los residuos sólidos peligrosos, deben ser descontaminados antes de ser descartados.
- El personal de laboratorio, debe recibir entrenamiento en bioseguridad sobre los riesgos potenciales asociados al trabajo desarrollado.

6.1.2. Equipo de protección personal

- No utilizar ningún tipo de joya, incluyendo el reloj, mientras se trabaje en el laboratorio.
- Utilizar equipo de protección personal (guantes descartables, mandilones, gorros, cubre zapatos, respirador N95), para mayor protección contra posibles salpicaduras, según el nivel de riesgo.
- No utilizar la ropa de trabajo fuera del laboratorio. Si es reutilizable, descontaminarla antes de lavarla.
- No guardar la ropa de trabajo junto con la ropa de calle.
- Tener disponibles a la vista de todo el personal los EPP para uso del personal.

6.1.3. Precauciones en la ejecución del cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

- Utilizar materiales de vidrio autoclavables o materiales descartables, los mismos que puedan ser esterilizados en la autoclave antes de su lavado o eliminación.
- Evitar generar aerosoles al trasvasar suspensiones o descartar sobrenadantes. Al trabajar con muestras clínicas sólo realizar movimientos decididos y suaves, sin generar salpicaduras. Dejar reposar 5 minutos los tubos agitados o centrifugados antes de abrir.
- En caso de derrame, limpiar el exterior de los tubos con gasa o papel absorbente embebido en la solución desinfectante de uso del laboratorio.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- No tocar la boca o paredes exteriores de los tubos con los frascos o pipetas utilizados para dispensar solución descontaminante o buffer. Si sucede, reemplazar el frasco o la pipeta y descartarlo como si estuviera contaminado.
- No abrir un envase o tubo conteniendo una muestra sin haber cerrado antes el anterior.
- No dejar destapados una serie de envases o tubos, en ningún paso del procesamiento.
- En caso de salpicadura accidental con líquido producto del procesamiento de las muestras clínicas, quitarse la ropa de trabajo, tratar como cualquier producto contaminado y reemplazarla.

6.1.4. 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 autoclavable al finalizar el trabajo.
- No bloquear las grillas/rejillas por las que circula el aire dentro de la cabina con ningún objeto. 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 que el flujo laminar sea el óptimo.
- Operar en la zona media de la cabina.
- No dejar destapados los tubos o frascos o botellas 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.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- 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 autoclavable.
- 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 15 min.
- 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.

6.1.5. 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 el agitador de tubos tipo vórtex, 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.

6.1.6. Plan de contingencia para accidentes de trabajo

- Los accidentes más graves son los que involucran rotura de tubos con cultivos positivos, por el alto número de bacilos que contienen.
- Esterilizar en autoclave los contenedores de tubos de la centrifuga 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 del accidente (o derrame) a fin de contenerlo, verter el desinfectante de uso





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

del 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 código de las muestras o cultivos que se 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.

6.1.7. 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 trabaja con tuberculosis es conveniente tener 2 cajas de limpieza de derrames, uno en el exterior del área de alto riesgo biológico y otro dentro.

La caja de limpieza de derrames debe contener: Solución desinfectante que inactive micobacterias (Ver Anexo 1), Respiradores N 95, Guantes (1 caja), cubre zapatos, Gorro quirúrgico, Mandiles impermeables, Papel absorbente, Alcohol de 70°, Gafas protectoras y bolsa roja de bioseguridad.

6.2. Tipo de muestra, transporte, recepción y conservación

6.2.1. Tipo de muestra

Usualmente la muestra más examinada es la muestra de esputo, debido a que la tuberculosis pulmonar es la más frecuente. Sin embargo, el bacilo de la tuberculosis puede llegar a cualquier órgano y producir la enfermedad, por lo que las muestras extrapulmonares pueden ser muy variadas como: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, sangre, pus de cavidades abiertas, biopsias. A todos estos tipos de muestras se les debe realizar el cultivo a fin de diagnosticar la enfermedad y aislar el microorganismo.

a) Muestras Pulmonares

Estas muestras provienen del árbol bronquial y pueden ser espontáneas o inducidas.

Expectoración Espontánea

- El esputo o expectoración obtenida de manera espontánea es considerada la de mejor rendimiento (tanto para baciloscopía, cultivo y pruebas moleculares) y para obtenerla, el paciente debe seguir las indicaciones del personal de salud, a fin de obtener una muestra de calidad.
- Es responsabilidad del personal de salud informar al paciente sobre la importancia de una expectoración de calidad, el cual debe provenir de los pulmones. Asimismo, informarle que la





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

mucosidad de la nariz, garganta y la saliva no son buenas muestras. Además, se le debe proveer al paciente un envase de plástico con tapa rosca (Figura 1).

- Al momento de dar las indicaciones, es importante que el personal de salud complete adecuadamente el formulario de solicitud de investigación bacteriológica y rotule el envase.
- Se recomienda al personal de la estrategia de TB, supervisar al paciente para obtener una buena muestra (mucopurulenta y espesa); sin embargo, se puede obtener también muestras de consistencia líquida o hemoptoicas. La muestra de menor calidad corresponde a aquella que está conformada de saliva, pero que también deben ser procesadas (Figura 2).
- Las muestras de esputo con resultado positivo de baciloscopia, son derivadas al laboratorio más cercano de su jurisdicción que realiza cultivo o prueba rápida para la detección de la resistencia, según corresponda.

Expectoración Inducida

La expectoración inducida está indicada en pacientes que no pueden producir una muestra espontánea o en niños. Se induce la expectoración por maniobras kinésicas o por nebulización laríngea. Considerar que puede producir muestras acuosas y que requiere de equipo y personal especializado.

- Obtención Postural:

Acostar al paciente boca abajo sobre una camilla o cama, haciendo que su cabeza rebese el borde; colocar una almohada doblada debajo del tórax para lograr un plano inclinado que facilite el descenso de la secreción. El paciente coloca la base del tórax sobre la almohada, deja caer ambos brazos y la cabeza hacia el piso, de modo que la base del tórax quede más alta respecto a la boca. Estando en la posición apropiada, se le indica al paciente que inspire, retenga el aire y expire fuerte hasta conseguir la expectoración; el envase deberá estar sobre un recipiente o papel periódico en el piso. El ambiente donde se obtiene la muestra debe tener buena ventilación y debe prohibirse la presencia de otras personas junto al paciente, durante el momento de la toma de la muestra. La muestra se procesa por examen directo y cultivo.

- Nebulizaciones:

Se nebuliza en la garganta con agua destilada. Se recoge la primera expectoración producida después de la nebulización y se le entrega al paciente otro envase para que recoja el esputo de las 24 horas siguientes. La muestra se entrega a la estrategia de tuberculosis y se procesa por examen directo y cultivo.

- Lavado Bronquial:

Es un procedimiento invasivo para obtención de secreción bronquial y está reservado al médico especialista, respetando las siguientes recomendaciones: tomar la muestra en una sala bien ventilada utilizando el respirador N 95. Para la obtención se utiliza un fibrobroncoscopio esterilizado



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

no más de 15 días. La muestra extraída debe ser enviada al laboratorio en cadena de frío para procesarla por baciloscopia y cultivo.

Calidad y Cantidad

- Una buena muestra es aquella que proviene del árbol bronquial, y es obtenida después de un esfuerzo de tos. Sin embargo, una muestra con apariencia de saliva puede ser positiva.
- La muestra de esputo para cultivo debe tener un volumen aproximado de 3 a 5 mL, obtenido de tres expectoraciones sucesivas. Si el paciente tiene escasa secreción, la muestra debe ser recolectada con más expectoraciones.
- Las muestras deben ser colectadas en frascos que sean herméticos, transparentes y resistentes a roturas.



Figura 1. Recipientes adecuados para la toma de muestras de esputo

MucopurulentaHemoptoica

Mucoide

Salival



Figura 2. Tipos de muestras de esputo

GUIA TÉCNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

Número de muestras y momento de la recolección:

- Según la Norma técnica de prevención y control de la tuberculosis del Ministerio de Salud, para realizar el diagnóstico de la tuberculosis por baciloscopia, se debe examinar dos muestras de esputo por cada sintomático respiratorio. La primera muestra debe obtenerse en el momento de la consulta y la segunda muestra al día siguiente, al despertar por la mañana.
- Si la sospecha de tuberculosis persiste, es necesario realizar el seguimiento diagnóstico con el estudio de más muestras por baciloscopia y cultivo.
- El laboratorio deberá evaluar las solicitudes bacteriológicas de los pacientes y disponer el envío de las muestras al laboratorio que realicen cultivo para su respectivo procesamiento, según los lineamientos de la Norma Técnica y disposiciones del MINSA.
- Para el control de tratamiento de la tuberculosis sensible, se indica realizar una baciloscopia mensual durante la terapia del paciente y un cultivo al finalizar el tratamiento. Para el control de tratamiento de todo paciente con TB mono, polirresistente y MDR, debe ser monitoreado con baciloscopia y cultivo de esputo mensuales durante todo el tratamiento (9).

El Envase:

- El envase adecuado debe tener las siguientes características (Figura 1).
- Boca ancha: no menos de 50 mm de diámetro.
- Cierre hermético: con tapa rosca para evitar derrames durante el transporte.
- Material de plástico: descartable, transparente y no reusable.
- Debe permitir rotular el nombre y código de identificación de la muestra en el cuerpo del envase.
- Capacidad de 30 a 50 mL: para facilitar que el paciente pueda depositar la expectoración o esputo con facilidad dentro del envase, sin ensuciar las paredes del frasco y que en el laboratorio se pueda seleccionar y tomar la partícula útil para realizar el extendido.

Momentos de la obtención de la muestra:

Primera muestra: Se toma siempre en el momento de la consulta (muestra inmediata), cuando el médico u otro personal del equipo de salud identifican al sintomático respiratorio. El procedimiento que ha de realizar es el siguiente:

- Tomar un envase nuevo para esputo y rotular en el cuerpo del envase: nombre del paciente y fecha de obtención de la muestra.
- Entregar el envase rotulado al paciente e indicar el lugar de obtención de la muestra de esputo. Este lugar debe contar con buena ventilación, y debe ofrecer intimidad para el paciente. Puede ser una habitación bien ventilada y con acceso a la luz natural o algún lugar abierto no concurrido del establecimiento de salud.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- El personal de salud explicará en forma sencilla al paciente las instrucciones que ha de seguir para que produzca el esputo: inspire profundamente, retenga el aire un momento y expulse luego la expectoración. El paciente deberá repetir el procedimiento hasta obtener la cantidad adecuada de la muestra.

Segunda muestra: El personal de salud entregará un envase al paciente, para la obtención de la segunda muestra. Esta se tomará al día siguiente, al despertar, en ayunas, enjuagándose previamente la boca solo con agua y siguiendo la misma explicación que le dio el personal de salud, para la obtención de la primera muestra. Una vez obtenida la muestra de esputo, el paciente cerrará bien la tapa del envase, la colocará en una bolsa de plástico y la llevará a la estrategia sanitaria de tuberculosis para que se remita al laboratorio inmediatamente, con la solicitud de investigación bacteriológica completamente llenada.

b) Muestras Extrapulmonares

Las muestras extrapulmonares (orina, líquido pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros) se procesan por cultivo, debido a la escasa cantidad de bacilos y presencia de micobacterias saprofitas.

- **Orina:**

La muestra de orina recomendada es la obtenida en la primera micción de la mañana, (previa higiene externa con agua). Descartar el primer chorro y recolectar una cantidad no menor de 50 mL en un envase limpio de boca ancha de aproximadamente 100 mL y se recomienda evaluar un mínimo de tres muestras. La muestra debe ser enviada al laboratorio de inmediato en un tiempo no mayor de 4 horas, porque el pH ácido afecta la viabilidad de la bacteria.

- **Lavado gástrico:**

La toma de muestra debe estar reservada al profesional de salud entrenado, su utilización es más frecuente en niños. La obtención se realiza por la mañana con el paciente en ayunas, utilizando una sonda nasogástrica para la aspiración del jugo gástrico. Se introduce una sonda de longitud y diámetro adecuado a la edad del paciente, hasta el estómago. Una vez que la sonda llega al estómago, se aspira con jeringa muy suavemente el contenido gástrico (usualmente de 3 – 5 mL) para que la succión no provoque daño. Inmediatamente después, vaciar la muestra en un envase limpio de 30 -50 mL, y enviar al laboratorio en un tiempo no mayor a 4 horas desde su obtención, en cadena de frío, a fin de procesar la muestra por cultivo. Se recomienda evaluar al menos tres muestras.

- **Líquidos pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros:**

La obtención de estas muestras está reservada al personal médico. El número de muestras y el volumen es el que estime el profesional médico. Utilizar envase estéril tapa rosca para colocar la muestra, la cual debe ser enviada al laboratorio y procesada lo más pronto posible, por cultivo.



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- **Líquido cefalorraquídeo:**

La obtención de la muestra está reservada al personal médico. El volumen aproximado es de 1-2 mL, se debe utilizar un envase estéril con tapa rosca para colocar la muestra. Tener en cuenta que mientras mayor sea la cantidad de volumen de muestra procesada, mayor es la posibilidad de hallazgo de bacilos.

- **Biopsias:**

La obtención de la muestra está reservada al personal médico, se debe utilizar envase estéril con tapa rosca para colocar la muestra. La muestra se divide en dos partes:

- Una para el estudio por cultivo, se envía al laboratorio en un frasco con solución fisiológica o agua destilada estéril para evitar la desecación de la muestra.
- Otra para el estudio histopatológico, se envía al laboratorio en un frasco con formol al 10%.

- **Otros:**

Secreción de herida, secreción de mama, placenta, cordón umbilical, semen y tejido de piel.

5.2.2 Transporte:

Para el transporte de las muestras se debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- 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.
- Cada envío debe ser acompañado con el formato de solicitud de investigación bacteriológica, verificando que el número de muestras correspondan al número de solicitudes.
- Contar con un servicio de movilidad para el transporte de muestras que incluya el itinerario y cronograma para el recojo de las mismas en todos los establecimientos de salud de su jurisdicción.

Transporte de muestras en el Nivel Local:

- El transporte de muestras dentro del EESS, desde la Estrategia de Tuberculosis del establecimiento al Laboratorio, se realizará utilizando las cajas de acero inoxidable. Todas las estrategias de TB del MINSA en los EESS cuentan con este recipiente. (Figura 3).



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS



Figura 3. Caja de acero para transporte de muestras

- Los Puestos de salud y Centros de Salud que no cuentan con laboratorio deben derivar las muestras al laboratorio más cercano de su jurisdicción, y transportar en contenedores de plástico resistente que incluyen porta frascos con divisiones para colocar los envases. El transporte estará a cargo del personal de salud, para el traslado seguro de la muestra (Figura 4).



Figura 4. Disposición de muestras de para su transporte a otro EESS

Transporte de muestras al Laboratorio de Nivel Regional y/o al laboratorio de referencia nacional de micobacterias del Instituto Nacional de Salud (LRNM-INS):

- Para el transporte de muestras de esputo desde los laboratorios de nivel local al LRR, y/o al LRNM-INS, se debe realizar según lo indicado en la NTS N° 153-MINSA/2019/INS: "Norma Técnica de Salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias Infecciosas" (11).





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

6.2.3 Recepción de muestras:

- La recepción de las muestras en el laboratorio se realizará cumpliendo las medidas de bioseguridad que correspondan.
- Las muestras deben estar protegidas de la luz solar.
- 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 1% o desinfectante de uso de laboratorio.
- Si el derrame es masivo en el paquete, se debe descontaminar y descartar la muestra, previa esterilización en autoclave.
- Evaluar la cantidad y la calidad de las muestras.
- Notificar y hacer las recomendaciones al establecimiento de salud remitente sobre las deficiencias de los envíos como, por ejemplo: identificación, calidad, volumen o la forma del envío.

6.2.4 Conservación:

La muestra de esputo, debe procesarse en el día después de la obtención, si no es posible procesarla el mismo día, se debe conservar en refrigeración entre 2 - 8 °C. En cuanto a los cultivos positivos, una vez realizada la lectura, deben ser enviados al laboratorio que corresponda, para la realización de la prueba de susceptibilidad a drogas.

6.3. CULTIVO

Las micobacterias son aerobios estrictos, los nutrientes básicos son la glicerina como fuente de carbono, asparagina como fuente de nitrógeno, la albúmina y los huevos de gallina que contienen alto contenido en proteínas y lípidos. Algunos medios sintéticos contienen biotina y catalasa para estimular el desarrollo de los bacilos. El pH en el que pueden desarrollarse las micobacterias es en un rango de 5.5 a 8.2; sin embargo, su crecimiento óptimo es en medio ligeramente ácido 6.4 a 6.8.



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

6.3.1 MÉTODO OGAWA

6.3.1.1 Fundamento

La naturaleza de las muestras clínicas complica ampliamente el proceso del cultivo y la detección del bacilo causante de la enfermedad, por lo que es necesario una descontaminación previa de la muestra con un agente químico que pueda eliminar el conjunto de microorganismos presentes en la muestra, usualmente las soluciones alcalinas fuertes como el NaOH al 4% son las más utilizadas para la descontaminación de muestras clínicas sospechosas de tuberculosis, ya que presenta una amplia y efectiva actividad bactericida sobre las bacterias acompañantes, pero presenta una baja actividad bactericida frente a las micobacterias, por las características propias de su envoltura celular. El medio de cultivo Ogawa en su constitución utiliza sales amortiguadoras de pH alcalino haciendo posible la siembra directa de una muestra clínica tratada previamente con NaOH al 4%. El punto crítico en la descontaminación con NaOH es el tiempo de exposición de la muestra a la solución alcalina fuerte, ya que una sobre exposición puede disminuir la población de micobacterias viables, por lo que no debe excederse el tiempo de la descontaminación por más de 20 minutos.

6.3.1.2. Equipos, Materiales y Reactivos

Equipos

- Cabina de bioseguridad clase II tipo A2
- Vórtex
- Dispensador autoclavable de acero inoxidable con jeringa graduada (0 a 5 mL o de 0 a 10 mL)
- Cronómetro
- Incubadora (37°C)
- Autoclave
- Baño maria
- Balanza analítica
- Coagulador de medios
- Hot plate

Materiales

- Recipiente de descarte de materiales contaminados con tapa
- Gradillas para tubo de centrifuga de 50 mL o 15 mL
- Pipetas de transferencia estériles de 3 mL
- Tubos de centrifuga estériles con tapa rosca de 50 o 15 mL, o tubos de vidrio estériles con tapa rosca de 20x150 mm
- Bolsas rojas de bioseguridad
- Pipetas de vidrio estériles de 10 mL





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- Papel absorbente con base plastificada impermeable
- Propipeta
- Gradilla de plano inclinado para tubos de 20x150 mm
- Pipeta Pasteur
- Frascos de borosilicato con tapa rosca de 1000 ml
- Probeta de vidrio de 1000 ml
- Matraz de 2000 ml

Reactivos

- Desinfectante para inactivar micobacterias de uso en el laboratorio (Ver Anexo 1).
- Hidróxido de Sodio al 4% (Anexo 2)
- Tubos con medio de cultivo Ogawa (Ver anexo 7)
- Alcohol al 70%

6.3.1.3 Condiciones de la Muestra

Usualmente las muestras negativas, muestras extrapulmonares y muestras de pacientes en tratamiento previo (seguimiento diagnóstico) son procesadas por este método de cultivo.

Las muestras que ingresarán a la prueba deberán cumplir con los siguientes requisitos:

- Las muestras no deben ser menores a 2 mL; de presentar un volumen menor (1 mL) deberán ser evaluadas por el personal de laboratorio para decidir su proceso.
- Las muestras no deben tener una antigüedad superior a 3 días, ya que el nivel de contaminación generado con el paso de los días afectará el desarrollo del cultivo.

6.3.1.4 Procedimiento

La descontaminación de las muestras de esputo se realizará en una cabina de bioseguridad clase II tipo A2, por el método de descontaminación con NaOH al 4%, como sigue:

- Colocar las muestras debidamente codificadas, de manera correlativa según el orden del laboratorio dentro de la cabina de bioseguridad.
- En un tubo de polipropileno colocar 1 mL de muestra de esputo con ayuda de una pipeta de transferencia estéril.
- Añadir 4 ml de NaOH al 4% y homogenizar con ayuda del agitador de tubos tipo vórtex durante 20 a 30 segundos aproximadamente.
- Incubar los tubos con muestra en Baño María o en la incubadora a 37°C hasta completar los 20 minutos.
- Retirar los tubos de incubación y homogenizar la muestra con la pipeta.
- Realizar la siembra 0.1 mL en cada uno de los tubos con medio Ogawa, haciendo que el líquido cubra por completo la superficie del medio.



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- No ajustar completamente las tapas de los tubos con medio de cultivo recién inoculados, a fin de lograr que la parte líquida de la siembra se evapore dentro de las 48 a 72 horas de incubación.
- Nota: La preparación del medio Ogawa se detalla en el Anexo 7, al igual que el registro de la preparación de los medios que se detalla en el Anexo 10. Se recomienda trabajar en series de 12 muestras.

6.3.1.5 Incubación

- Colocar los tubos con la siembra en la incubadora a 37°C.
- Realizar una primera revisión de los cultivos a las 48 o 72 horas, para observar si existe contaminación.
- Durante la primera revisión, ajustar completamente las tapas de los tubos asegurándose que ya no haya líquido en los tubos.
- En caso de detectar contaminación (medio licuado por acción de gérmenes proteolíticos producto de una descontaminación deficiente) como: tubo alcalinizado (color blanco amarillento) o tubo acidificado (color verde oscuro) se procederá a realizar la resiembra si aún se conserva la muestra o se procederá a solicitar una nueva muestra.

6.3.1.6 Lecturas

- La primera lectura de los cultivos se realiza a los 7 días, para evidenciar el desarrollo de colonias de algunas micobacterias de crecimiento rápido.
- Las lecturas de los cultivos se realizarán a los 7 días, 15 días, 21 días, 30 días, 45 días y 60 días. (ver anexo 11). Durante estos días se debe ir registrando los cultivos positivos y en aquellos cultivos donde no se observan crecimiento, debe continuar su incubación hasta los 60 días.

6.3.1.7 Informe de Resultados

Escala semicuantitativa para reporte de resultados de cultivos en medio sólido

Negativo (-)	No se observan colonias en los tubos luego de la inspección de la octava semana de incubación.
Nº de colonias	Entre 1 y 19 colonias en el total de medios sembrados.
Positivo (+)	20-100 colonias.
Positivo (++)	Más de 100 colonias separadas
Positivo (+++)	Colonias incontables confluentes (desarrollo en toda la superficie del medio)
Contaminado	Ambos tubos inoculados se encuentran contaminados.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- La cantidad de colonias es la suma obtenida en todos los tubos si desarrollan hasta 19 colonias. Si supera este número, para transformar la lectura en escala de cruces, se promedia el desarrollo observado en todos los tubos. (2).
- Los resultados se registrarán en el libro de registros de cultivos del laboratorio (Anexo 11), así como en el sistema Informático NetLab v.2. y la lectura de los cultivos se realizará siguiendo la escala semicuantitativa.

6.3.1.8 Control de Calidad

a) Control de calidad interno

Mediante el control de calidad interno se busca evaluar la calidad de lotes del medio de cultivo teniéndose en cuenta los siguientes aspectos:

Evaluación del Aspecto físico:

Color: Los tubos de un mismo lote que presentan distinta intensidad de verde evidencian mala homogenización o residuos en los tubos. Un verde muy oscuro evidencia exceso de verde de malaquita o pH muy ácido. Medios muy amarillentos pueden indicar defecto de verde de malaquita o pH muy alcalino.

Consistencia: Si el medio se desintegra fácilmente, la temperatura de coagulación no ha sido suficiente. Esto se puede verificar extrayendo al azar tubos de un lote de medios recién preparados, dando pequeños golpes al tubo sobre la mano. El medio que no tiene buena coagulación, se resquebraja, se rompe y se desprende de la pared del tubo, no tiene consistencia y no son adecuados para su uso.

Textura / Homogeneidad: Formación de burbujas al dispensar el medio a los tubos o luego de la coagulación aparecen burbujas. Es posible que el medio haya estado sometido a temperatura excesiva y por lo tanto haya perdido calidad. Tampoco deben verse grumos, indicadores de mala homogenización.

Sensibilidad: Se verifica, realizando la siembra de 0.2 mL por tubo (Dilución 1/10.000 de una suspensión de una cepa de H37Rv, turbidez de la escala de Mc Farland N°1), en 5 tubos de medio de cultivo de un lote anterior y en 5 tubos del lote nuevo, tomados al azar. Si el número de colonias obtenidas en el lote nuevo es significativamente menor al obtenido con el lote anterior (como referencia), la sensibilidad es inadecuada.

Esterilidad: Incubar de 35° a 37°C, una muestra de tubos tomados al azar del lote de medios recién preparados (5 tubos), incubar los tubos durante 48 h y dejarlos a temperatura ambiente, las subsiguientes 48 h para controlar la esterilidad. No debe observarse desarrollo de gérmenes de lo contrario eliminar todo el lote.

Nota: Para el registro del control de calidad de medio sólido utilizar los Anexos 16, 17, 18 y 19.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

b) Control de calidad externo

El control de calidad externo se realizará en coordinación y siguiendo los procedimientos establecidos por el LRNM del INS.

6.3.2 CULTIVO EN MEDIO SÓLIDO LÖWENSTEIN JENSEN (Método NALC-NaOH)

6.3.2.1 Fundamento

Mediante el cultivo es posible hacer que los bacilos presentes en las muestras clínicas se multipliquen in vitro hasta que se muestren formando colonias en un medio sólido. La mayoría de las muestras contienen gérmenes comunes por lo que es necesario homogenizar las muestras densas como el esputo y eliminar la flora acompañante mediante el proceso de descontaminación.

Normalmente el proceso de descontaminación se realiza con una solución alcalina fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH) al 4% que descontamina y emulsifica la mezcla, pero para mejorar la actividad de la descontaminación puede incluirse: un agente mucolítico como el NALC, que es comúnmente usado para digerir el esputo y además se utiliza el Citrato de Sodio que presenta un efecto estabilizante sobre el NALC porque realiza un secuestro (quelación) de iones de metales pesados (10)

El medio de Löwenstein-Jensen es uno de los medios de cultivo sólidos que se emplea en microbiología para el aislamiento de micobacterias. Los nutrientes que utiliza este medio facilitan el crecimiento de las micobacterias (excepto *M. leprae*, agente causal de la lepra). Contiene verde de malaquita que inhibe el desarrollo de la flora microbiana acompañante y potencialmente contaminante (sobre todo de bacterias Gram positivas), glicerina que actúa como fuente de carbono y asparagina e iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes, lo que facilita el crecimiento de *M. tuberculosis*.

Ya que el medio Löwenstein Jensen no presenta entre sus componentes sales que le proporcionen características amortiguadoras de álcalis o bases fuertes, es necesario que el tratamiento previo de las muestras clínicas sea con el método de descontaminación con NALC - NaOH y neutralizadas con Buffer fosfato.

6.3.2.2 Equipos, Materiales y Reactivos

Equipos

- Cabina de bioseguridad clase II tipo A2
- Centrifuga refrigerada con recipientes con tapa anti aerosoles



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- Vórtex
- Cronómetro
- Incubadora (37°C)
- Autoclave
- Baño maría (37°C)
- Balanza Analítica
- Coagulador de medios
- Hot plate

Materiales

- Recipiente de descarte de materiales contaminados con tapa.
- Gradillas para tubos de centrifuga de 50 mL
- Gradillas de plano inclinado para tubos de 20x150 mL
- Pipetas de transferencia estériles de 3 mL
- Probetas graduadas de 100 ó 250 mL
- Bolsas rojas de bioseguridad
- Tubos cónicos de polipropileno estériles con tapa rosca de 50 mL.
- Pipetas de vidrio estériles de 1 y 10 mL
- Papel absorbente con base plastificada impermeable
- Propipeta.

Reactivos

- Desinfectante para inactivar micobacterias de uso del laboratorio
- Solución descontaminante
- Buffer Fosfato
- Medio de Cultivo Löwenstein-Jensen en Tubos de vidrio de 20x150 mL.
- Alcohol al 70%.

6.3.2.3 Condiciones de la Muestra

Las muestras de que serán procesadas por este método deberán tener un volumen mínimo de 3 mL, no deberán presentar restos alimenticios, no deberán presentar hemoptisis y deben procesarse hasta dentro de las 72 horas de haber sido colectadas. En el caso de las muestras extrapulmonares, deberán procesarse dentro de las 4 horas siguientes a su obtención.



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

6.3.2.4 Procedimiento

- La descontaminación de las muestras de esputo se realizará en una cabina de Bioseguridad clase II tipo A2, por el método de N-acetil-L-Cysteina-NaOH.
- Enumerar los tubos cónicos (falcon) con los códigos correspondientes a cada muestra
- Con una pipeta de transferencia, tomar un volumen de 3 a 5 mL de cada muestra y dispensar en un tubo cónico de centrifuga de 50 mL con tapa rosca estéril.
- Registrar el volumen y el aspecto de la muestra en el tubo
- Usando una pipeta serológica de vidrio estéril de 10 mL, agregar igual volumen de solución descontaminante a cada una de las muestras (en proporción 1:1), ajustar las tapas y mezclar cada tubo en un vórtex por 10 a 20 segundos. Si la muestra es particularmente viscosa, añadir más solución descontaminante (max. 1.5 mL) y mezclar.
- Dejar actuar la solución de descontaminación hasta completar 15 minutos en baño maría o en la incubadora a 37°C (no exceder los 20 minutos) Si no se dispone de dichos equipos se deberá dejar las muestras a temperatura ambiente dentro de la cabina de bioseguridad.
- Agregar a cada tubo con muestra, buffer fosfato pH 6.8 hasta completar 50 mL y mezclar por inversión.
- Usando una centrifuga refrigerada, centrifugar durante 15 minutos a 3000 g a una temperatura de 10°C.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento agregando 1.5 mL de buffer fosfato pH 6.8, ajustar las tapas y mezclar usando el vórtex. El exceso de buffer podría incidir en la sensibilidad de la prueba.
- Con una pipeta serológica de 1 mL realizar la siembra en dos tubos de medio de cultivo Löwenstein-Jensen, añadiendo 0.2 mL de sedimento resuspendido a cada tubo, previamente rotulados con la fecha de siembra y el código correspondiente.
- No ajustar completamente las tapas de los tubos con medio de cultivo recién inoculados, a fin de lograr que la parte líquida de la siembra se evapore dentro de las 48 a 72 horas de incubación.

Nota: La preparación del medio Löwenstein Jensen se detalla en el Anexo 08, del mismo modo se debe utilizar el Anexo 15, para el registro de la preparación de cada lote de medio. Se recomienda trabajar en series de 12 muestras.

6.3.2.5 Incubación

- Colocar los tubos con la siembra en una estufa incubadora a 37°C.



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- Realizar una primera revisión de los cultivos a las 48 o 72 horas, para observar si existe contaminación.
- Durante la primera revisión, también se procederá a ajustar completamente las tapas de los tubos asegurándose que ya no haya líquido en los tubos.
- En caso de detectar contaminación (medio licuado por acción de gérmenes proteolíticos producto de una descontaminación deficiente) como: tubo alcalinizado (color blanco amarillento) o tubo acidificado (color verde oscuro) se procederá a realizar la resiembra si aún se conserva la muestra o se procederá a solicitar una nueva muestra.

6.3.2.6 Lecturas

- La primera lectura de los cultivos se realizará a los 7 días, a fin de evidenciar el desarrollo de colonias de algunas micobacterias de crecimiento rápido.
- Las lecturas de los cultivos se realizarán a los 7 días, 15 días, 21 días, 30 días, 45 días y 60 días (Anexo 14). Durante estos días se debe ir registrando los cultivos positivos y en aquellos cultivos que continúan su negatividad, seguir su incubación hasta los 60 días

6.3.2.7 Informe de Resultados

Escala semicuantitativa para reporte de resultados de cultivos en medio sólido

Negativo (-)	No se observan colonias en los tubos luego de la inspección de la octava semana de incubación.
Nº de colonias	Entre 1 y 19 colonias en el total de medios sembrados
Positivo (+)	20-100 colonias
Positivo (++)	Más de 100 colonias separadas
Positivo (+++)	Colonias incontables confluentes (desarrollo en toda la superficie del medio)
Contaminado	Ambos tubos inoculados se encuentran contaminados

La cantidad de colonias es la suma obtenida en todos los tubos si desarrollan hasta 19 colonias. Si supera este número, para transformar la lectura en escala de cruces, se promedia el desarrollo observado en todos los tubos.

Los resultados se registrarán en el libro de registros de cultivos del laboratorio (Anexo 15), así como en el sistema Informático NetLab v.2. y la lectura de los cultivos se realizará siguiendo la escala semicuantitativa detallada en el cuadro anterior



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

6.3.2.8 Control de Calidad

a) Control de calidad interno

Mediante el control de calidad interno se busca evaluar la calidad de lotes del medio de cultivo teniéndose en cuenta los siguientes aspectos:

Evaluación del Aspecto físico:

Color:

Los tubos de un mismo lote que presentan distinta intensidad de verde evidencian mala homogenización o residuos en los tubos. Un verde muy oscuro evidencia exceso de verde de malaquita o pH muy ácido. Medios muy amarillentos pueden indicar defecto de verde de malaquita o pH muy alcalino.

Consistencia:

Si el medio se desintegra fácilmente, la temperatura de coagulación no ha sido suficiente. Esto se puede verificar extrayendo al azar tubos de un lote de medios recién preparados, dando pequeños golpes al tubo sobre la mano. El medio que no tiene buena coagulación, se resquebraja, se rompe y se desprende de la pared del tubo, no tiene consistencia y no son adecuados para su uso.

Textura / Homogeneidad:

Formación de burbujas al dispensar el medio a los tubos o luego de la coagulación aparecen burbujas. Es posible que el medio haya estado sometido a temperatura excesiva y por lo tanto haya perdido calidad. Tampoco deben verse grumos, indicadores de mala homogenización.

Sensibilidad:

Se verifica, realizando la siembra de 0.2 mL por tubo (Dilución 1/10.000 de una suspensión de una cepa de H37Rv, turbidez de la escala de Mc Farland N°1), en 5 tubos de medio de cultivo de un lote anterior y en 5 tubos del lote nuevo, tomados al azar. Si el número de colonias obtenidas en el lote nuevo es significativamente menor al obtenido con el lote anterior (como referencia), la sensibilidad es inadecuada.

Esterilidad:

Incubar de 35° a 37°C, una muestra de tubos tomados al azar del lote de medios recién preparados (5 tubos), incubar los tubos durante 48 h y dejarlos a temperatura ambiente, las subsiguientes 48 h para controlar la esterilidad. No debe observarse desarrollo de gérmenes de lo contrario eliminar todo el lote.

Nota: Para el registro de control de calidad de medio sólido utilizar los anexos 16, 17, 18 y 19





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

b) Control de calidad externo

El control de calidad externo se realizará en coordinación y siguiendo los procedimientos establecidos por el LRNM del INS.

6.3.3 CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO (BACTEC MGIT 960 TB)

6.3.3.1 Fundamento

BACTEC MGIT 960 es un sistema automatizado, no radiométrico, que utiliza el tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT). El tubo MGIT contiene 7 mL de caldo base Middlebrook 7H9 enriquecido con OADC, esencial para el crecimiento de micobacterias, especialmente las que pertenecen al complejo MTB; y suplementado con la mezcla antibiótica PANTA para inhibir cualquier tipo de contaminación producto de bacterias acompañantes propias de la muestra clínica.

Un compuesto fluorescente (pentahidrato de rutenio) está incluido en un tapón de silicona en el fondo del tubo, este compuesto es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el medio líquido. Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno disuelto inhibe las emisiones del compuesto y se puede detectar muy poca fluorescencia. Sin embargo, cuando los microorganismos activos, consumen el oxígeno, permiten que se detecte la fluorescencia. Esta prueba es considerada como una prueba rápida ya que puede entregar resultados de positividad a partir de los 7 días.(10)

6.3.3.2 Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Cabina de bioseguridad de Clase II, Tipo A2.
- Equipo *BACTEC MGIT 960*
- Vórtex
- Autoclave.
- Refrigeradora (2 – 8 °C).
- Micropipetas (100 – 1000 µL)
- Incubadora (37°C)
- Temporizador
- Baño maría
- Centrifuga refrigerada
- Balanza Analítica





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

Materiales

- Pipetas serológicas de y 10 mL.
- Pipetas automáticas o micropipetas de 0.5 a 1 mL
- Propipeta
- Plumones Marcadores Indelebles
- Bolsa de bioseguridad para descarte de material dentro de la cabina.
- Papel absorbente para cubrir la superficie de la CSB
- Gasa y/o paño para limpieza de superficies
- Recipiente de descarte de materiales contaminados con tapa
- Gradilla para tubos de 50 mL
- Pipetas de transferencia estéril 3 mL
- Tips con filtro de 1000 µL
- Tubos de centrifuga de 50 mL de polipropileno (base cónica) con tapa rosca
- Láminas porta objetos
- Placas petri descartables

Reactivos

- *BD BBL™ MGIT™ Tubo MGIT* con 7mL de medio
- *MGIT™ PANTA™* Mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos.
- Suplemento de crecimiento *BACTEC MGIT*
- Solución de descontaminación (NALC-NaOH).
- Buffer Fosfato Ph 6.8
- Alcohol al 70%
- Solución desinfectante para inactivar Micobacterias de uso del laboratorio
- Agar BHI

6.3.3.3 Condiciones de la Muestra

Las muestras deben colectarse en recipientes limpios, estériles con tapa rosca, con un volumen de aproximadamente 3 a 5 mL, con tiempo de recolección no mayor a 72 h, de pacientes con baciloscopia negativa, radiografía anormal, de personal de salud, pacientes con coinfección VIH-TB y muestras extrapulmonares (excepto sangre, orina y heces), muestras pediátricas, pacientes con Diabetes, contactos TB, muestras de esputo pacibacilares.

Las muestras después de su obtención deben ser enviadas de inmediato al laboratorio para su análisis; los retrasos en el transporte, podrían dar un aumento en la contaminación de bacterias. Si no se puede realizar la prueba el mismo día, conservar la muestra en refrigeración de 2 – 8 °C,





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

reconsiderar el tiempo para muestras de esputo y muestra extrapulmonares. Es importante registrar la fecha de toma de muestra en la solicitud de investigación bacteriológica.

6.3.3.4 Procedimiento

a) Etapa pre analítica

Preparación de la solución de digestión/descontaminación (NALC-NaOH):

- Preparar la solución descontaminante según el Anexo 3.
- Añadir 50 mL de la solución descontaminante al tubo falcon que contiene 0.25 gr de NALC y utilizar dentro de las 24 horas.

Nota: El NALC no es estable en solución y puede perder su actividad mucolítica cuando precipita.

Preparación de la Mezcla antibiótica *BBL MGIT PANTA*:

- Reconstituir un vial liofilizado de mezcla antibiótica *BBL MGIT PANTA* con 15 mL de suplemento de crecimiento *BACTEC MGIT-AODC*, almacenar en refrigeración de 2 – 8 °C hasta por 5 días como máximo.

b) Etapa analítica

Procedimiento de digestión, descontaminación e inoculación de la muestra

Enumerar el tubo MGIT con el código correspondiente para cada muestra y añadir asepticamente 0.8 mL de suplemento PANTA reconstituido al tubo MGIT. La adición de suplemento de crecimiento/mezcla antibiótica MGIT PANTA se hará antes de abrir cualquier muestra, ya sea aseptica o no.

La descontaminación de las muestras se llevará a cabo por el método de descontaminación N-acetil-L-Cysteina-NaOH. Seguir las instrucciones detalladas en el punto 5.3.2.4

Nota: Si el volumen inicial de la muestra es mayor a 10 mL (lavado bronquial o contenido gástrico, líquido pleural, etc.) centrifugar a 3000 g x 15 min, para concentrar la muestra y luego descontaminar siguiendo el procedimiento similar al esputo.

Si la muestra fuera tomada asepticamente (LCR, líquido pleural y líquido sinovial) se realizará la siembra directamente al tubo MGIT con PANTA. Sin embargo, si no se garantiza la esterilidad, se recomienda que estas muestras deban ser descontaminadas. Si la cantidad de la muestra es pequeña, sembrar toda la muestra.

Siembra de la muestra en tubos MGIT

- Se inoculará 0.5 mL del sedimento resuspendido en buffer fosfato, a los tubos MGIT con suplemento PANTA.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- Mezclar bien los tubos inoculados por inversión varias veces
- Registrar los datos de las muestras procesadas en la base de datos Excel del laboratorio.
- Incubar los tubos tan pronto como sea posible en el equipo *BACTEC MGIT 960*, los cuales serán analizados automáticamente; para ello: abrir uno de los compartimentos del equipo, presionar el botón de ingreso de tubos indicado en la pantalla. Escanear el código de barra del tubo MGIT con el lector de código de barras que estará iluminado en el equipo, ubicar el tubo en la estación iluminada dentro del cajón y cerrar el compartimento.

6.3.3.5 Resultados

Lectura de los cultivos tubos MGIT

El equipo detectará un tubo MGIT positivo mostrando una luz roja y la ubicación exacta en el compartimento del equipo *BACTEC 960*. El tubo se retirará del compartimento y el código de barras del tubo será escaneado en el lector de código de barras del equipo. El crecimiento de MTB aparecerá en forma de flóculos o clamps y sin turbidez. Retirar el tubo MGIT positivo y agitar en el vórtex, colocar en una gradilla, con la ayuda de una pipeta descartable estéril extraer una alícuota y sembrar una gota a una placa de agar BHI e incubar a 37 °C de 24 - 48 horas, además realizar un frotis con 1 ó 2 gotas en una lámina portaobjeto, y colorear con la técnica ZiehlNeelsen; también realizar un test Inmunocromatográfico para confirmar si el cultivo pertenece al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

6.3.3.6 Interpretación de resultados:

Resultado positivo. Se informará así cuando se observen cordones en la coloración ZiehlNeelsen (detectar la presencia de BAAR) y no hay crecimiento en la placa de agar BHI.

Si en una lectura positiva, no hay crecimiento en la placa de agar BHI y no se observan cordones en lectura de la lámina, continuar la incubación del tubo en el equipo BACTEC por 3 días más y repetir nuevamente la coloración por ZiehlNeelsen. Si el segundo resultado del frotis es positivo y la placa de agar BHI continua negativo, la muestra debe reportarse como POSITIVA. Si la segunda lámina y el agar sangre o BHI siguen siendo negativos continuar la incubación de la muestra en el equipo *BACTEC* hasta completar los 42 días.

Resultado contaminado. Se reportará así cuando el crecimiento bacteriano se observa en menos de 7 días de TTD (Tiempo de detección), con resultado de frotis negativo y con crecimiento en la placa de agar BHI. Si hay crecimiento en la placa de agar BHI y se observan cordones en la lectura de la lámina, se debe realizar la repetición de la descontaminación a partir del tubo MGIT.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

Resultado negativo. Se considera así cuando la incubación fue por un período de 42 días. Los tubos negativos deben ser inspeccionados visualmente y si se observa crecimiento puntiforme o cualquier otro indicio de crecimiento, evaluar para ver positividad.

6.3.3.7 Informe de resultados

Los resultados serán ingresados al sistema NetLab v.2 por el analista, y luego verificado por el responsable del Laboratorio o por la persona que dicho responsable del laboratorio designe. Los usuarios autorizados a través de la página Web del INS, podrán acceder al sistema NetLab v.2, para visualizar los resultados e imprimir y entregar al solicitante

6.3.3.8 Control de Calidad

a) Control de calidad interno

Se deben realizar controles de calidad periódicos de todos los reactivos utilizados, tales como N-acetil-L-Cysteina-NaOH, y Buffer Fosfato. Para una mejor vigilancia de la contaminación, es importante incluir un control negativo en la serie o grupo de muestras y de ser necesario también un control positivo para controlar el crecimiento de MTB (el control positivo puede realizarse una vez por semana).

Controles positivos y negativos

- Control negativo, utilizar 5 mL de buffer fosfato.
- Control positivo, utilizar 5 mL de suspensión de MTB con dilución 1:5 (tomar 1 ml del tubo con turbidez McFarland 0.5 en 4 ml de agua destilada estéril o solución salina).
- Procesar controles negativos y positivos junto con muestras clínicas, utilizando el mismo método de digestión y descontaminación. Inocular e incubar de manera similar las muestras procesadas. El control positivo debe mostrar el crecimiento de MTB entre 4 a 13 días. El control negativo no debe mostrar ningún crecimiento en el período de protocolo de incubación. Si el control negativo, muestra fluorescencia positiva, comprobar la presencia de micobacterias de lo contrario investigar posible fuente de contaminación.

Se realizará un control interno de los reactivos comerciales cada vez que exista un cambio de lote. Este se realizará con un control positivo y un negativo. Estos controles deberán ser procesados por duplicado, un proceso con los reactivos del anterior lote y el otro proceso con los reactivos del nuevo lote. No deberá existir diferencia entre los resultados de uno y otro lote. El registro de los resultados deberá ser realizado.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

b) Control de calidad externo

El control de calidad externo se realizará en coordinación y siguiendo los procedimientos establecidos por el LRNM del INS.

VII. RECOMENDACIONES

- a) Complementar con la difusión de la presente Guía Técnica del POE de CULTIVOS para Diagnóstico de 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.

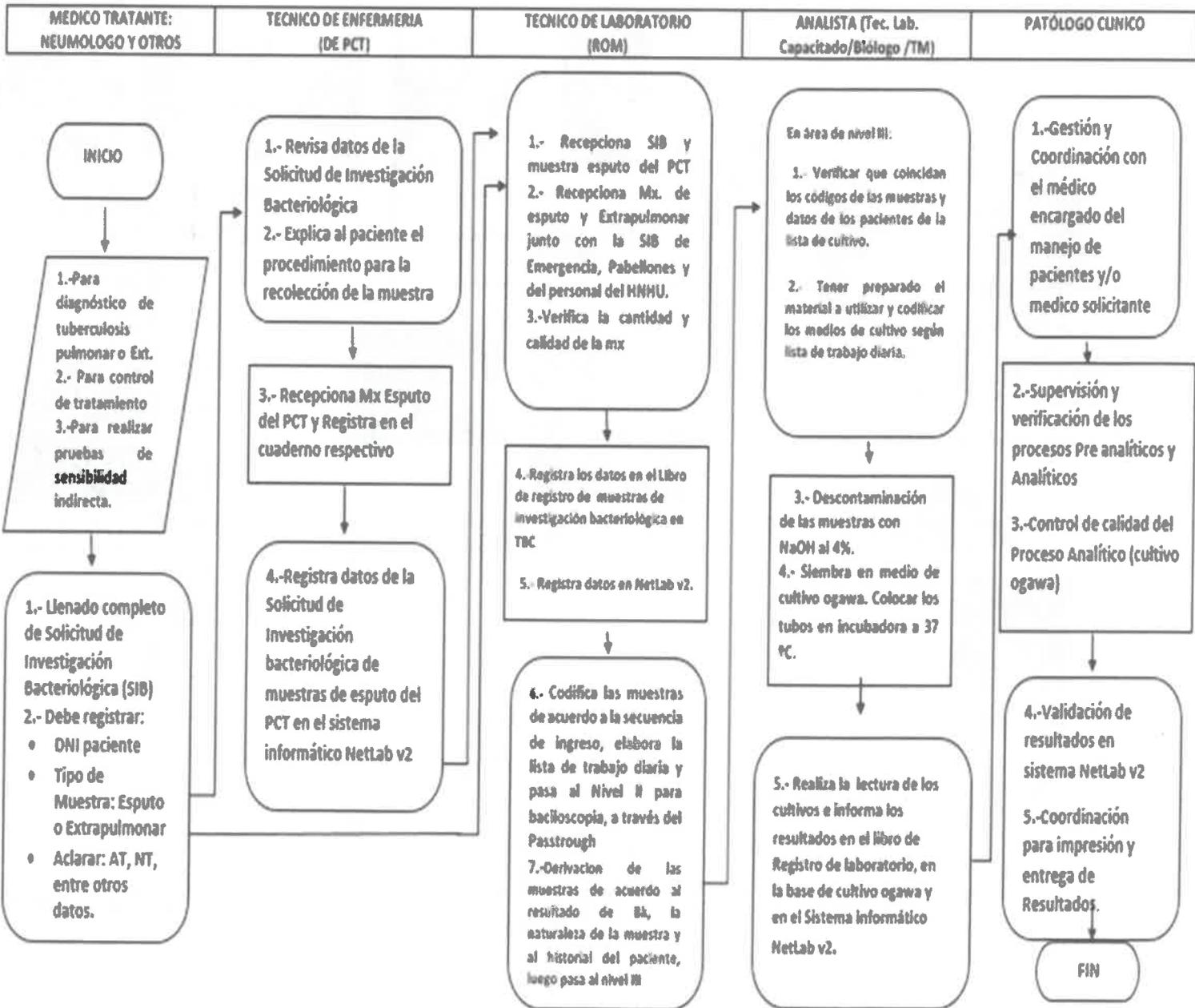




GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS VIII. ANEXOS

ANEXO 01: FLUJograma DE ATENCION DE CULTIVO OGAWA DE CASOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HHNU

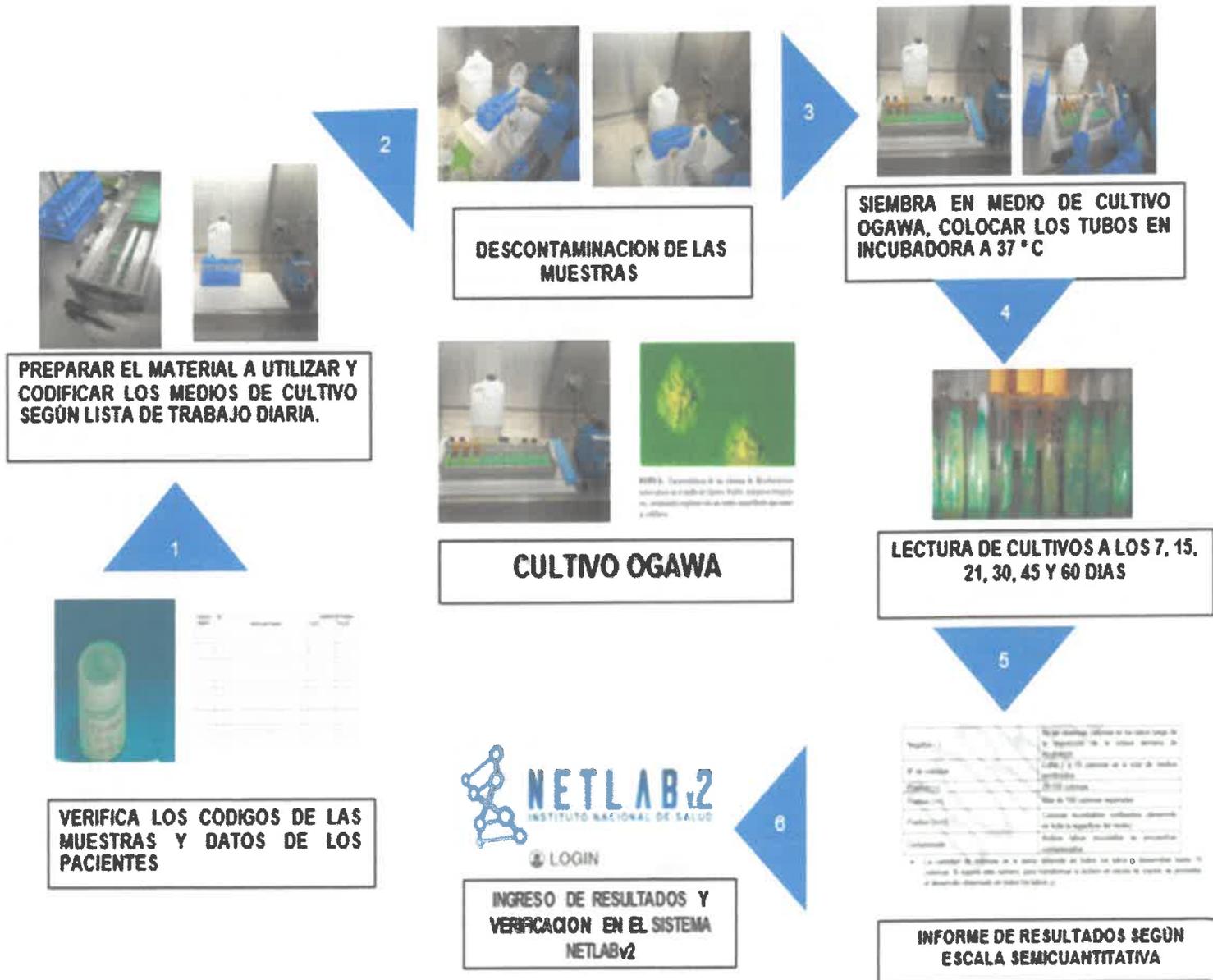
FLUJograma DE ATENCION DE CULTIVO OGAWA DE CASOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HHNU



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 02: FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO OGAWA PARA INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS

FLUJOGRAMA DE PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO OGAWA PARA INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS



HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE
 DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA CLÍNICA
 DR. MADYS PATINO SOTO

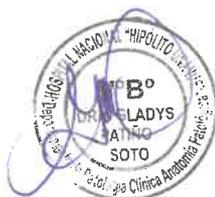
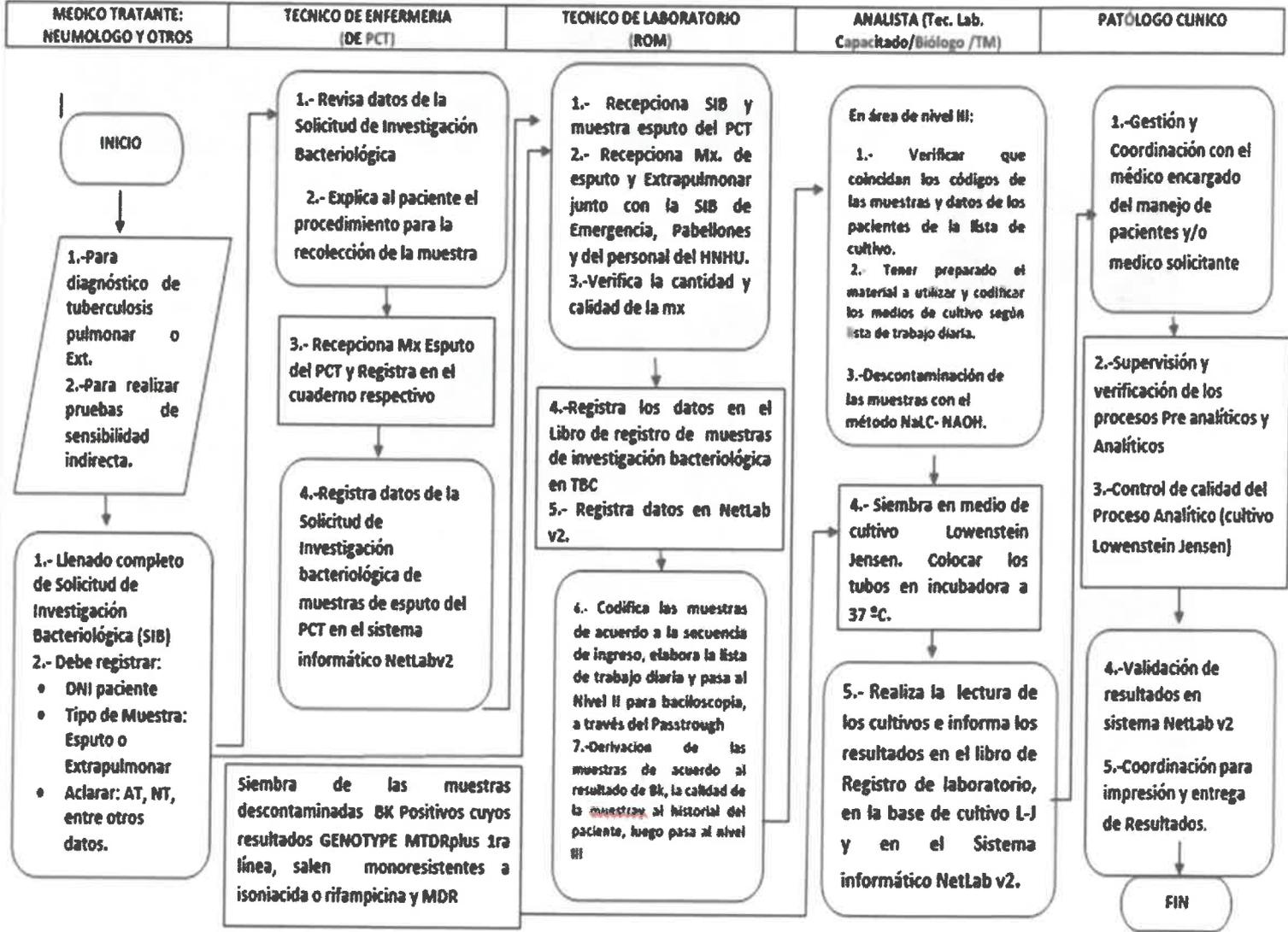
MINISTERIO DE SALUD
 INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

MINISTERIO DE SALUD
 CENEX
 LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 03: FLUJograma DE ATENCION DE CULTIVO LOWENSTEIN JENSEN PARA INVESTIGACION EN TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HNHU

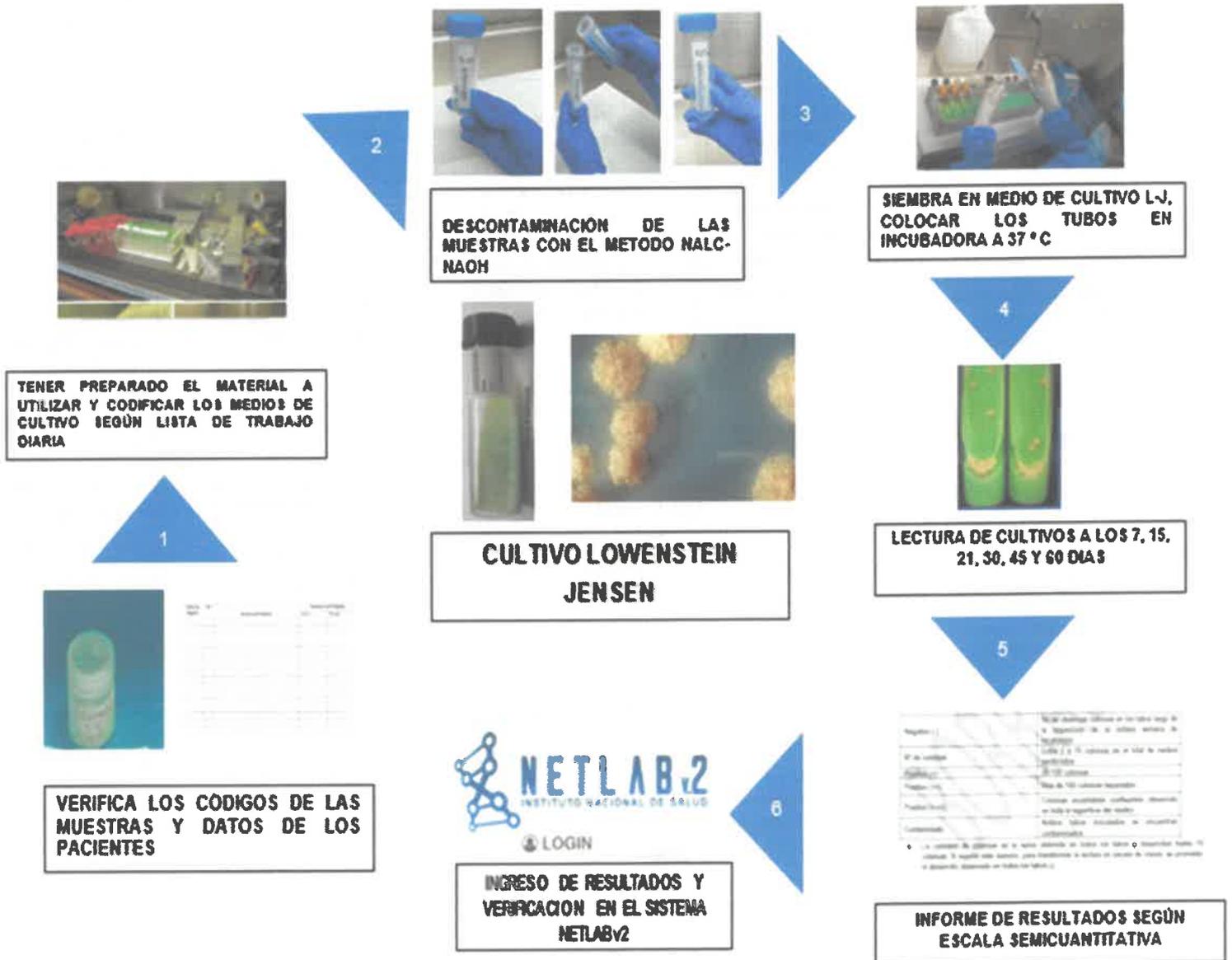
FLUJograma DE ATENCION DE CULTIVO LOWENSTEIN JENSEN PARA INVESTIGACION EN TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HNHU



GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 04: FLUJograma DE PROCEDIMIENTO DE CULTIVO LOWENSTEIN JENSEN PARA INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS

FLUJograma DE PROCEDIMIENTO DE LOWENSTEIN JENSEN PARA INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS

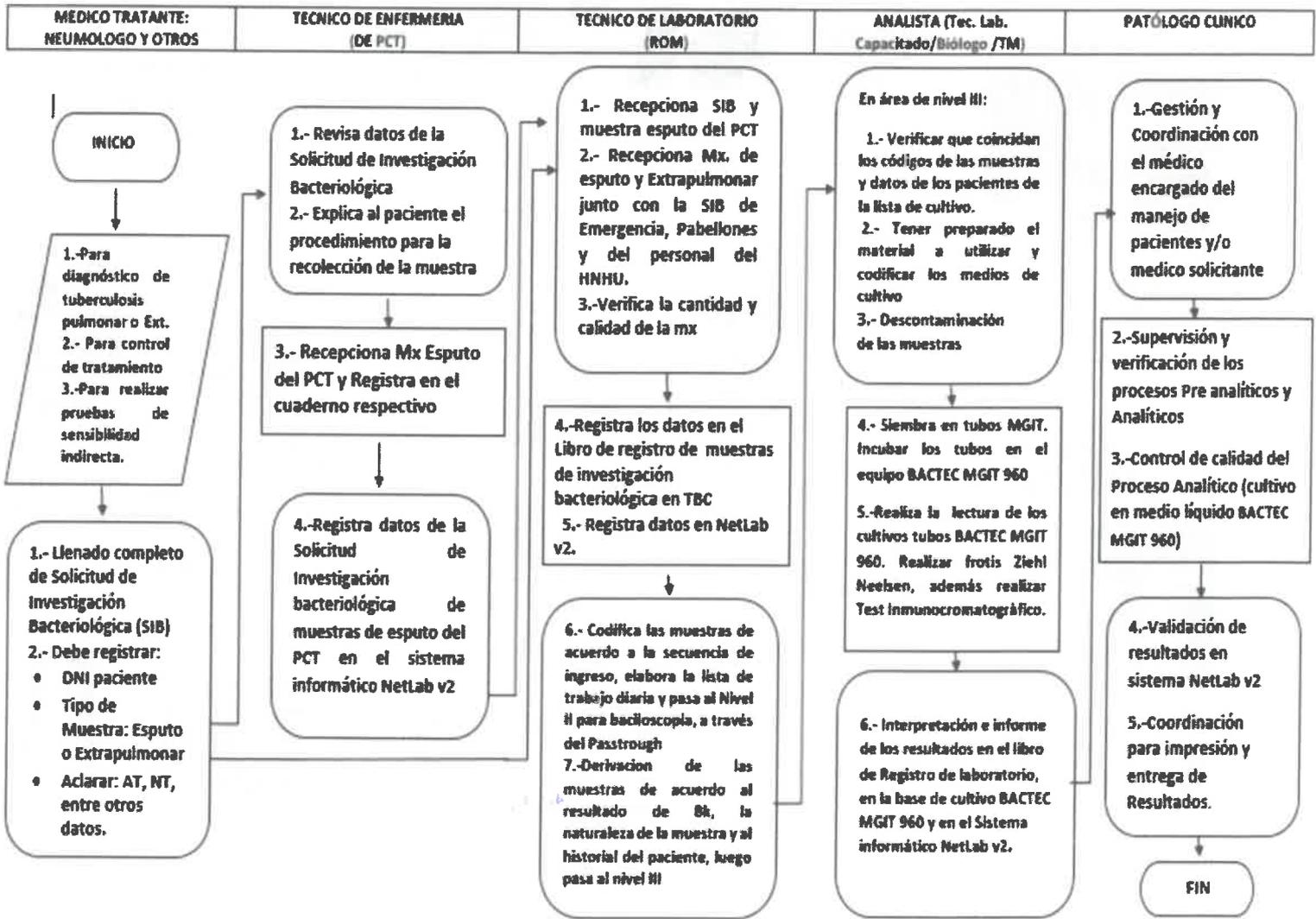




GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 05: FLUJograma DE ATENCION DE CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO BACTEC MGIT 960 TB DE CASOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HNHU

FLUJograma DE ATENCION DE CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO BACTEC MGIT 960 TB DE CASOS SOSPECHOSOS DE TUBERCULOSIS PARA PCT, EMERGENCIA, PABELLONES Y TRABAJADORES DE SALUD DEL HNHU

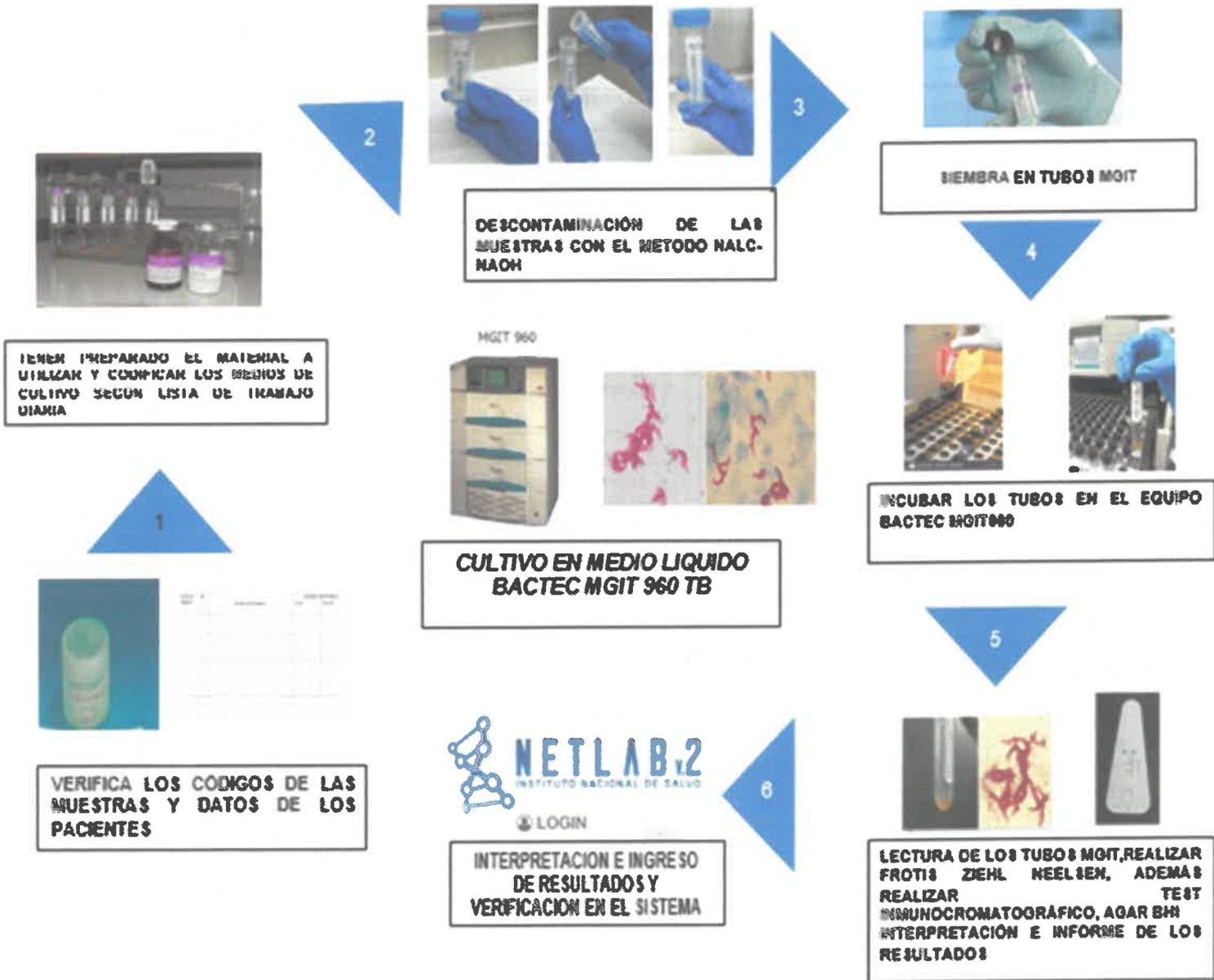




GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 06: FLUJograma DE PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO BACTEC MGIT 960 TB PARA INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS

FLUJograma DE PROCEDIMIENTOS DE CULTIVO EN MEDIO LIQUIDO BACTEC MGIT 960 TB PARA INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE
TUBERCULOSIS
ANEXO 07

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. La solución 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 su toxicidad y su olor, generalmente se utilizan derivados de fenol en lugar de fenol puro. Ej. VESPHENE al 0.8% (mezcla de o-phenylphenol y p-tertiarylamylphenol).
CLORO	La solución de hipoclorito sódico (lejía doméstica) contiene 50 g/L de cloro disponible, por lo que deben diluirse en la proporción 1:50 o 1:10 en agua para obtener concentraciones finales de 1 g/L ó 5 g/L. Las diluciones deben prepararse cada día. Se utilizará la siguiente formula $C1 \times V1 = C2 \times V2$. La lejía puede usarse como desinfectante de uso general y para remojar material contaminado sin metales, ya que dada su naturaleza alcalina puede corroer los metales. La ingestión accidental de una pequeña cantidad de hipoclorito 3-6% 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 puede causar quemaduras, inflamación, ampollas e irritación de los ojos. Nota: Utilizar 1% de Hipoclorito de sodio para limpieza de superficies y 5% en caso de derrames y desinfección de material contaminado.
ALCOHOL	Los alcoholes como por ejemplo el etanol, se utilizan 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 introducir las en la autoclave. La solución de alcohol al 70% solo 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 alcohol es que no deja residuo en los objetos tratados.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 08

PREPARACIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO AL 4%

Para cada 100 de solución

Reactivo	Cantidad
NaOH	4g
Agua destilada	100 mL





TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 09

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE

Hidróxido de Sodio al 4%

Reactivo	Cantidad
NaOH	4 g
Agua destilada	100 mL

Citrato de Sodio al 2.9%

Reactivo	Cantidad
Citrato de Sodio	2.9 g
Agua destilada	100 mL

- Juntar volúmenes de cada una de las soluciones y mezclarlas (proporción 1:1), homogenizar y dispensar en recipientes pequeños con 50 ml de solución. Esterilizar en autoclave (121°C por 15 min).
- Cada vez que se realice el proceso de descontaminación por este método será necesario añadir justo antes del proceso 0.25 g de N-Acetil- L- Cysteina (NALC) por cada 50 ml de solución. Disolver la sal con movimientos suaves de rotación, para evitar perder la actividad mucolítica del NALC.

Preparación de la solución de digestión – descontaminación

*Volumen Total (mL) de solución descontaminante a preparar	Cantidades Necesarias (mL) de		NALC añadido (g)
	NaOH 4% w/v (*)	Citrato de Sodio 2H2O 2.9% w/v (**)	
50	25	25	0.25
100	50	50	0.50
200	100	100	1.00
500	250	250	2.50
1000	500	500	5.00

(*) Añadir 4 g de NaOH a 100 mL de agua destilada.

(**) Añadir 2.9 g de citrato de sodio anhidro a 100 mL de agua destilada.





GUIA TECNICA DEL

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS
ANEXO 10

PREPARACIÓN DE BUFFER FOSFATO PH 6.8

Solución A

Reactivo	Cantidad
Fosfato di sódico (HNa_2PO_4)	9.47 g
Agua destilada	1000 mL

Solución B

Reactivo	Cantidad
Fosfato Mono potásico (KH_2PO_4)	9.07 g
Agua destilada	1000 mL

- Mezclar las dos soluciones y homogenizar
- Medir el pH. Añadir la solución "A"; para aumentar pH y la solución "B", para disminuir pH.
- Dispensar en un recipiente con los volúmenes deseados para el proceso de descontaminación y autoclavar (121°C por 15 min).
- Registrar por cada preparación en el Registro de preparación del Buffer fosfato (PBS) pH 6.8.

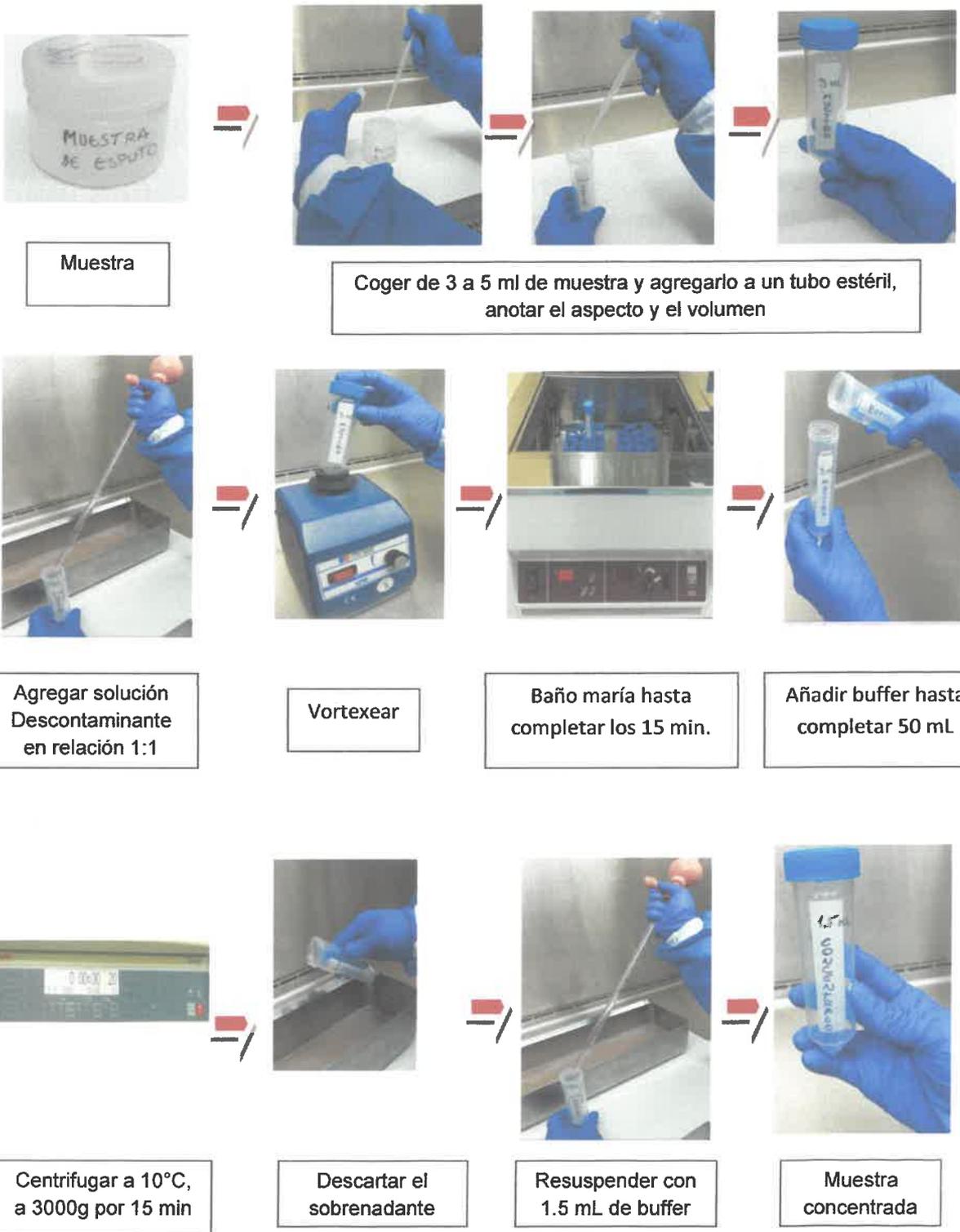




GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 11

FLUJOGRAMA DE LA DESCONTAMINACIÓN CON EL MÉTODO NALC-NAOH





GUÍA TÉCNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 12

Preparación de agar infusión cerebro corazón (BHI)

- Pesar 52 g de agar
- Suspender 52 g del medio en 1 litro de agua destilada o desionizada
- Homogenizar a calor de 45°C con agitación frecuente.
- Hervir a 100°C por un minuto
- Autoclavar a 121°C por 15 minutos.
- Dispensar 16 mL en placas Petri estériles.
- Dejar enfriar hasta que coagule el medio.
- Registrar cada preparación en el Registro de preparación de BHI.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 13

PREPARACIÓN DEL MEDIO OGAWA

Ingredientes:

- Fosfato Monopotásico (KH_2PO_4) 1 g
- Glutamato de sodio ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) $\geq 99.5\%$ de pureza 1.0 g
- Agua destilada 100 mL
- Glicerina ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) $\geq 99.5\%$ de pureza 6 mL
- Verde de Malaquita 2% 6 mL
- Huevo homogenizado 200 mL

Estas cantidades sirven para obtener un promedio de 50 tubos con medio de cultivo. De acuerdo a la necesidad de medios de cultivo por la carga de trabajo será necesario calcular las cantidades de los reactivos en función a los valores mencionados.

Procedimiento

a) Preparación de Solución de Sales:

- Disolver en 100 mL de agua destilada, el fosfato monobásico de potasio, y el glutamato de sodio y colocar en baño maría a 100°C por 30 minutos o en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Agregar la glicerina.
- Dejar enfriar.

b) Preparación del verde de malaquita al 2%:

Verde de malaquita 2 g

Agua destilada estéril 100 mL

- Homogeneizar el verde de malaquita en agua destilada y colocar el matraz dentro de un baño maría (37°C) hasta su total disolución.
- Guardar en un frasco color ámbar por una semana como máximo, en el caso que se observe precipitación, proceder de inmediato a la preparación de un nuevo lote de verde de malaquita. Caso contrario realizar la preparación cada vez que se elabore un lote.

c) Preparación del huevo homogenizado:

- Lavar los huevos con detergente, enjuagar con agua de caño, dejar secar a temperatura ambiente.
- Limpiar los huevos con algodón embebido en alcohol al 70% y dejar secar.
- Romper los huevos uno por uno y verter en un vaso de precipitado pequeño, para comprobar si están en buenas condiciones, de lo contrario descartar y cambiar de vaso.
- Vaciar los huevos en un beaker y homogenizar con una bagueta estéril o batidora, filtrar utilizando cuatro capas de gasa estéril.



**GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS**

- Adicionar 6 mL de verde de malaquita a la solución de sales previamente preparado y mezclar bien.
- Agregar el huevo homogenizado lentamente por la pared del matraz evitando la formación de burbujas.
- Mezclar suavemente y dejar reposar por 30 minutos.

Nota: Medir el pH del medio, pH aproximado de 6.8.

d) Distribución del Medio:

En tubos de 20x125 mm distribuir el medio en una proporción de 6.5 mL por tubo; en tubos de 20x150 mm distribuir en una proporción de 7.5 mL por tubo; y en tubos de 16x125 mm distribuir 5 mL de medio por tubo, evitando la formación de burbujas.

e) Coagulación del Medio:

Colocar los tubos inclinados en el coagulador a 90°C por 60 minutos con las tapas ligeramente flojas (el coagulador debe haberse encendido previamente hasta lograr la temperatura deseada). Al terminar el proceso de coagulación, se procederá a retirar los tubos del coagulador y se dejará enfriar.

f) Control de calidad:

Realizar el control de calidad interno detallado en el punto 4.1.8

g) Conservación del Medio:

Guardar el medio preparado en bolsas de plástico y cerrarlas herméticamente, anotando la fecha de preparación y número de lote.

Los medios pueden guardarse en refrigeración (2 a 8°C) hasta por un mes. Deberán ser almacenados y protegidos de la luz directa, en recipientes adecuados.





GUÍA TÉCNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 14

PREPARACIÓN DE MEDIO LÖWENSTEIN JENSEN

Ingredientes:

- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 2.4 g
- Sulfato de Magnesio ($\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.24 g
- Citrato de Magnesio ($\text{C}_6\text{H}_6\text{MgO}_7$) 0.6 g
- L-Asparagina ($\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$) 3.6 g
- Glicerina ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) $\geq 99.5\%$ de pureza 12 mL
- Agua destilada c.s.p. 600 mL
- Huevo 1000 mL
- Verde de Malaquita 2% 20 mL

Estas cantidades sirven para obtener un promedio de 240 tubos con medio de cultivo. De acuerdo a la necesidad de medios de cultivo por la carga de trabajo será necesario calcular las cantidades de los reactivos en función a los valores mencionados.

Procedimiento:

a) Preparación de sales:

- Disolver las 3 primeras sales y la asparagina en 300 mL de agua destilada en un matraz de 2000 mL, calentar en baño María hasta la disolución de la asparagina, completar a 600 mL con agua destilada.
- Agregar 12 mL de glicerina.
- Esterilizar en Baño María x 30 minutos o autoclavar a 121°C x 15 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente

b) Preparación del verde de malaquita al 2%:

Verde de malaquita 2 g

Agua destilada estéril 100 mL

- Homogeneizar el verde de malaquita en agua destilada y colocar el matraz dentro de un baño maría (37°C) hasta su total disolución.
- Guardar en un frasco color ámbar por una semana como máximo, en el caso que se observe precipitación, proceder de inmediato a la preparación de un nuevo lote de verde de malaquita. Caso contrario realizar la preparación cada vez que se prepare un nuevo lote.

c) Preparación de huevos homogeneizados:



**GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS**

- Lavar los huevos con detergente, enjuagar con agua de caño, dejar secar a temperatura ambiente.
- Limpiar los huevos con algodón embebido en alcohol al 70% y dejar secar.
- Romper los huevos uno por uno y verter en un vaso de precipitado pequeño para comprobar si están en buenas condiciones, de lo contrario descartar y cambiar de vaso.
- Vaciar los huevos en un beaker y homogenizar con la batidora, filtrar en una probeta de 1000 mL utilizando gasa estéril de cuatro capas
- Agregar la solución acuosa de verde de malaquita al 2 % a la solución de sales.
- Agregar la suspensión de huevos homogenizados.
- Mezclar suavemente con movimientos circulares.
- Dejar reposar el medio preparado por 30 minutos hasta que desaparezcan las burbujas. Cubrir con una franela de color oscuro para protegerlo de la luz.

Nota: Medir el pH del medio, pH aproximado de 6.8.

d) Distribución del Medio:

- Distribuir 6.5 mL de medio en tubos de 20x125 mm con tapa rosca; 7.5 mL a tubos de 20 x150 mm; y 5 mL en tubos de 16x125 mm. Evitar la formación de burbujas dispensando el medio por las paredes del tubo.

e) Coagulación del Medio:

- Colocar los tubos con medio en el coagulador a 80 - 85°C por 45 minutos.
- Retirar los tubos y dejar enfriar al medio ambiente.
- Ajustar las tapas.

Nota: El coagulador debe de haberse encendido previamente hasta lograr la temperatura deseada.

f) Control de calidad:

- Realizar el control de calidad interno detallado en el punto 4.3.8 o 4.4.8.

g) Conservación del Medio:

- Guardar el medio preparado en bolsas de plástico y cerrarlas herméticamente, anotando la fecha de preparación, fecha de vencimiento y número de lote.
- Los medios pueden guardarse en refrigeración (2 a 8°C) hasta por un mes. Deberán ser almacenados protegidos de la luz directa y en recipientes adecuados.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

- Si se repite la contaminación en muestras derivadas por un mismo servicio, se procederá a coordinar los envíos más oportunos y en condiciones apropiadas.

Incremento inusual del número o frecuencia de cultivos positivos en un corto periodo de tiempo.

Investigar:

- La posibilidad de que haya existido contaminación cruzada y por lo tanto falsos resultados positivos de cultivo.
- Se verificará que los pacientes involucrados no tengan clínica compatible con tuberculosis.
- Se verificará que no se repite el aislamiento a partir de otra muestra de estos pacientes.
- Una o varias muestras involucradas en el episodio resultaron con un cultivo con escasas colonias y fueron procesadas inmediatamente después de una muestra con alta carga de bacilos (baciloscopia positiva). Estos hallazgos sustentan la sospecha de que existió transferencia de bacilos de la muestra con alta carga bacilar a las otras que resultaron con escaso número de colonias. Si, además, se constata que resultaron positivos sólo los cultivos de muestras que han sido descontaminadas, se sospecha que la transferencia fue realizada mediante las soluciones o instrumentos utilizados durante el proceso de descontaminación.

En caso de demostrar, o no la contaminación cruzada verificar si:

- Se están alicuotando y descartando remanentes de los reactivos utilizados en el procesamiento de muestras.
- Se mantienen los cuidados al dispensar soluciones dentro de los tubos.
- Se mantiene el orden recomendado para el procesamiento de muestras.
- No se abren tubos en serie, simultáneamente.
- No se abren tubos inmediatamente después de retirados de la centrífuga.
- Si se descartan con suavidad y precaución los sobrenadantes.
- Resulta de interés para controlar la calidad del cultivo, clasificar a los pacientes adultos que se hayan diagnosticado con tuberculosis pulmonar confirmada bacteriológicamente, en alguna de las siguientes categorías:

a=Baciloscopia (+) y cultivo (+)

b=Baciloscopia (+) y cultivo no realizado

c=Baciloscopia (-) y cultivo (+)

d=Baciloscopia (+) y cultivo (-)

e=Baciloscopia (+) y cultivo contaminado

f=Baciloscopia no realizada y cultivo (+)

Con el total de casos clasificados en cada una de estas categorías, se podrán calcular los siguientes indicadores:

Aporte del cultivo al diagnóstico =

$$\frac{C}{a + b + c + d + e} \times 100$$





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 15

CONTROL DE CALIDAD DE LOS DOCUMENTOS Y REGISTROS DE LABORATORIO

El responsable del laboratorio deberá supervisar al menos una vez por mes:

- Que las muestras recibidas para investigación diagnóstica sean diferenciadas de las recibidas para control de tratamiento. Esto permite interpretar los resultados, orientar la secuencia de estudios bacteriológicos necesarios para cada paciente y mantener un seguimiento de los resultados bacteriológicos como método de control de calidad interno. De haberse observado deficiencias, introducir medidas correctivas tomando contacto con las personas que reciben y envían las muestras.
- Hacer seguimiento del proceso diario de las muestras, de tal manera que no se registren demoras.
- La elaboración de una ficha individual para cada paciente que tenga resultado positivo conteniendo todos los resultados bacteriológicos obtenidos con muestras de ese paciente, puede mantenerse en una base de datos en computadora. Esto permite seguir la evolución bacteriológica del paciente, desencadenar estudios adicionales en el caso de que sean requeridos y detectar posibles inconsistencias, cuyas causas deben ser investigadas.
- Los aislamientos de los pacientes que lo requieran y que hayan sido derivadas para identificación y prueba de sensibilidad.

Seguimiento de los resultados:

Muestra con baciloscopia positiva y cultivo negativo. Investigar:

- Si la muestra ha sido tomada para control de tratamiento. En este caso, el resultado puede reflejar simplemente que el paciente está eliminando bacilos muertos o no viables lo que indicaría que el tratamiento es efectivo.
- Si la muestra ha sido tomada para diagnóstico, se estará alerta para verificar si este tipo de resultado se repite, se investigará si la sensibilidad del lote del medio en uso resultó buena, si la concentración del descontaminante y el tiempo de tratamiento con él son los normalizados, y si la temperatura de la estufa de incubación no excedió el límite aceptable. Puede tratarse también de un error en la obtención o transcripción de la información acerca de la historia de tratamiento del paciente.

Muestra contaminada. Investigar:

- Si transcurrió un tiempo excesivo entre el momento de la toma y el procesamiento, en este caso se reorganizará el transporte de muestras o se corregirá la rutina de trabajo del laboratorio, según corresponda.
- Si se repite la contaminación en muestras del mismo paciente, se procederá a utilizar técnicas más enérgicas de descontaminación para investigar las muestras sucesivas de ese individuo.





GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

Nota: El cultivo es más sensible que la baciloscopia, se espera que su aporte al diagnóstico de las formas pulmonares del adulto, sea por lo menos de un 20% de los casos con confirmación bacteriológica.

Relación entre resultados de baciloscopías y cultivos:

Las muestras investigadas para diagnóstico con resultado de baciloscopia positivo deben tener normalmente resultado de cultivo positivo. El grado de positividad del cultivo (en escala de cruces) debe normalmente ser igual o mayor al de la baciloscopia (también en escala de cruces). Más de 3% de muestras cuyo resultado de cultivo tenga un grado de positividad menor al de la baciloscopia es motivo de investigación

Analizando el resultado de las muestras de esputo investigadas para diagnóstico se puede calcular:

Porcentaje de muestras baciloscopia (+) cultivo (-) =

d / (a + b + c + d + e) x 100

Esta proporción debería ser muy baja; alrededor del 2 - 3%, de otra forma se impone la necesidad de investigar fallas técnicas. Excepcionalmente se encuentran enfermos cuyas baciloscopías de diagnóstico son sistemáticamente positivas y sus cultivos negativos. En general, se trata de muestras de un paciente de quien se desconoce que están bajo control de tratamiento





GUÍA TÉCNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

	ANEXO 16	FOR-CENEX/HNHU-009
	CONTROL DE PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO OGAWA	
Edición N° 02		

INSUMOS	INFORMACIÓN DE LOS INSUMOS					PRODUCTO FINAL			
	MARCA	N° Lote	F. Apertura	F. Expiración	Cantidad usada	Analista Responsable	Fecha Preparación	N° Lote	Observaciones
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)								
Glutamato de Sodio (C ₅ H ₈ NNaO ₄ .H ₂ O)								
Verde de Malaquita Oxalato - C ₆ H ₄ O ₈ N ₄ .H ₂ C ₂ O ₄					/.....
Glicerina 99.5% (C ₃ H ₈ O ₃)								
Huevos Frescos								
Agua Destilada								

NI: NO INDICA Iniciales del analista : Fecha: Supervisor:

Responsable de Laboratorio:

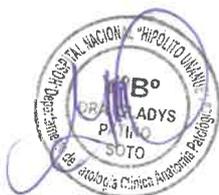




GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

BIBLIOGRAFIA

1. Instituto Nacional de Salud. Manual de normas y procedimiento en bacteriología de tuberculosis. Serie de normas técnicas N° 10. 2005.
2. Organización Panamericana de la Salud. Manual Para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 2 Cultivo. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. 2008.
3. Fajardo Dubón, Germán Edgardo y Cols. Tuberculosis Pulmonar y métodos diagnosticos laboratoriales actuales. Rev.fac.cienc.méd (impr); 35-44, jul-dic 2018.
4. Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de Tuberculosis. Suiza. 2013
5. Dorronsoro, I y Torroba L. Microbiología de la Tuberculosis. An. Sist. Sanit. Navar. 2007; Vol 30 (Supl. 2): 67 – 84.
6. Pérez, E y Manjarrez, B. Tuberculosis por Mycobacterium bovis: ¿una infección reemergente? Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, vol. 55, núm. 5, 2017.
7. Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos Bioseguridad en los Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos. Serie de Normas Técnicas INS. Norma Técnica N.º 18. 2005.
8. Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Salud Pública. Laboratorio Nacional de Referencia de Micobacterias. Manual de Procedimientos para el diagnóstico de Tuberculosis mediante CULTIVOS. 2019.
9. Modificatoria de la NTS N° 104 – 2018/MINSA. Norma Técnica para la atención integral de las personas afectadas por Tuberculosis. ⁵⁷
10. Siddiqi S & Rüschi-Gerdes S. MGIT™ Procedure Manual For BACTEC™ MGIT 960™ TB System. Foundation for Innovative Diagnostics. Julio 2006.
11. NTS N° 153-MINSA/2019/INS: "Norma Técnica de Salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias Infecciosas".

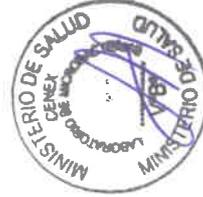




GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS

ANEXO 20		FOR-CENEX/HNHU-014
CONTROL DE CALIDAD INTERNO (CRUCE DE LOTES) DEL METODO DE AISLAMIENTO BACTEC MGIT 960		
		Edición N° 02

N° de Lote Anterior	Fecha de apertura del lote	Fecha inicio Test	Cepa Control	Código tubo MGIT	Placa Agar Sangre/BHI	LECTURA BK	IDENTIFICACIÓN COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Ag MPT64)	Fecha Final Test	Tiempo De Detección (TDD)	Conclusión de Resultado	ANALISTA	Observaciones
N° de Lote Nuevo	Fecha de apertura del lote	Fecha inicio Test	Cepa Control	Código tubo MGIT	Placa Agar Sangre/BHI	LECTURA BK	IDENTIFICACIÓN COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (Ag MPT64)	Fecha Final Test	Tiempo De Detección (TDD)	Conclusión de Resultado	ANALISTA	Observaciones
CONCLUSION:												





PERÚ

Ministerio de Salud

Hospital Nacional Hipólito Unanue

DPTO. PATOLOGIA CLINICA Y ANATOMIA PATOLOGICA

"MICROBIOLOGIA, INMUNOLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR"

GUIA TECNICA DEL PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTANDAR DE CULTIVOS PARA DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS



ANEXO 18

FOR-CENEX/HHU-010

CONTROL DE PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO LOWENSTEIN-JENSEN

Edición N° 02

INSUMOS	INFORMACION DE LOS INSUMOS							PRODU CTO FINAL		
	MARCA	N° Lote	F. Apertura	F. Expiración	Cantidad usada	Analista Responsable	Fecha Preparación	N° Lote	pH	Observaciones
Fosfato de potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)										
Sulfato de Magnesio heptahidratado (MgSO ₄ · 7H ₂ O)										
Citrato de Magnesio (C ₆ H ₆ MgO ₇)										
L-Asparagina anhidra (C ₄ H ₈ N ₂ O ₃)										
Verde de Malaquita Oxalato (C ₅ O ₄ H ₂ O ₈ N ₄ · H ₂ C ₂ O ₄)										
Glicerina 99.5% (C ₃ H ₈ O ₃)										
Huevos Frescos										
Agua Destilada										

Iniciales del analista:

Fecha:

Supervisor:

54



**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 2022, 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 y técnico del Laboratorio de Micobacterias y Biología Molecular (Laboratorio del Cenex del HHU):

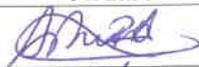
AGENDA:

- 1.- Revisar la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Cultivos para Diagnóstico de Tuberculosis, con la participación del personal del Laboratorio de Micobacterias y Biología molecular que realiza las pruebas de Cultivos 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 Cultivos para Diagnóstico de Tuberculosis.

ACUERDOS:

- 1.- Luego de la revisión de la Guía Técnica del Procedimiento Operativo Estándar de Cultivos para Diagnóstico de 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 Cultivos para Diagnóstico de 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 2022.**

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

NOMBRE	PROFESIÓN	FIRMA
M.C: Astrid Rodriguez Agreda	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	
Lizbeth Curtihuaranca Merida	Biólogo	
Jhonattan Saman Ballarta	Tecnólogo médico	
Elizabeth Villavicencio Rosales	Tecnólogo médico	
Wilder Quiroz Rodriguez	Técnico de Laboratorio	
Julio Angel Cornelio Vera	Técnico de Laboratorio	



