

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

GUÍA TÉCNICA PARA CULTIVO DE MICOBACTERIAS EN MEDIO LÍQUIDO

2018

La presente versión responde fielmente al contenido de la Resolución Exenta N° 808 del 03.04.2018 del Instituto de Salud Pública de Chile, que aprueba el presente documento

AUTORES

TM. Angélica Scappaticcio Bordón.

Encargada Área Susceptibilidad Micobacterias.
Sección Micobacterias.
Subdepartamento Enfermedades Infecciosas
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Fabiola Arias Muñoz.

Jefe Sección Micobacterias.
Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

TM. Javier Figueroa Oviedo.

Profesional Área Susceptibilidad Micobacterias.
Sección Micobacterias.
Subdepartamento de Enfermedades Infecciosas
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.

Jefe Subdepto Coordinación Externa.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile

Dr. Juan Carlos Hormazábal Opazo

Jefe Subdepto. Enfermedades Infecciosas
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

GUÍA TÉCNICA PARA CULTIVO DE MICOBACTERIAS EN MEDIO LÍQUIDO

I. Alcance	5
II. Introducción	5
III. Abreviaturas	5
IV. Desarrollo	6
1. Principio del cultivo en medio líquido	6
2. Equipo BACTEC™ MGIT 960™	7
a. Soporte de tubos MGIT™	7
b. Estaciones	8
c. Unidad de detección	8
d. Indicadores de estado del cajón	8
e. Escáner de código de barras	9
f. Pantalla LCD y teclado	9
3. Funcionamiento del equipo MGIT™	10
a. Definición de unidad de crecimiento (UC)	10
b. Rutina diaria de inicio MGIT™	10
c. Mantenimiento del filtro equipo MGIT™	12
4. Procedimientos para el cultivo en medio líquido	12
a. Reconstitución de reactivo MGIT™ PANTA	12
b. Inoculación de tubos MGIT™	12
c. Introducción de los tubos en el equipo MGIT™	13
d. Incubación de tubos MGIT™	13
5. Tratamiento de resultados	14
a. Tratamiento de los tubos negativos	14
b. Tratamiento de los positivos	15
c. Realización de tinción Ziehl-Nelsen desde medio líquido MGIT™	16
i. Procedimiento de la tinción	17
ii. Precauciones	17
d. Interpretación de resultados MGIT™	18
i. Detección de crecimiento positivo	18
ii. Verdaderos positivos para MGIT™	19
iii. Sospecha de Micobacterias No Tuberculosas (MNT)	20
iv. Tinción de Ziehl-Neelsen positivo más contaminación	20
v. Cultivo tubo MGIT™ contaminado	21
vi. Cultivo tubo MGIT™ positivo temprano	21

6. Procedimientos para la resolución de problemas de contaminación.	23
a. Contaminación bacteriana.	23
b. Contaminación cruzada.	23
c. Reducción de tasas de contaminación.	23
7. Control de calidad.	24
a. Control de calidad de los medios MGIT™.	24
b. Control de calidad del equipo MGIT™.	28
c. Control de calidad de la técnica de cultivo.	28
d. Control de calidad con datos de laboratorio.	28
8. Identificación rápida del Complejo MTBC con test inmunocromatográfico.	26
a. Propósito.	26
b. Principio.	26
c. Procedimiento y recomendaciones.	26
i. Preparación de muestras.	26
ii. Realización de técnica con tubos MGIT™ positivos.	27
iii. Inoculación del dispositivo de prueba de identificación (ID).	27
iv. Interpretación de resultados.	27
v. Control de calidad interno del test de identificación rápida.	28
V. Referencias bibliográficas.	29

I. ALCANCE.

Esta guía aplica a los laboratorios clínicos públicos y privados que realizan la técnica de cultivo de Koch en medio líquido MGIT™ (Mycobacteria Growth Indicator Tube).

II. INTRODUCCIÓN.

La elección del medio líquido MGIT™ para la detección de *Complejo Mycobacterium tuberculosis* en una muestra, cuando se compara con los medios sólidos tradicionales, se debe a su capacidad de reducir el tiempo de detección y su mayor sensibilidad en la recuperación de micobacterias. Por lo anterior, el CDC de Estados Unidos, en el año 1993, elaboró una recomendación a todos los laboratorios clínicos para estimular el uso de medios líquidos en conjunto con medios sólidos (Centro de Control y Prevención de Enfermedades, Documento nº M24-A, NCCLS. 2003.), en sintonía con las pautas similares emanadas al respecto desde la OMS/OPS (Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud), en “Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis-5th ed. 2015. Ver: 3.1.2 Phenotypic DST, Page 10”.

Esta metodología permite una evaluación semicuantitativa de la carga bacteriana del tubo de cultivo líquido por medio de los sistemas de instrumentos automáticos BACTEC™-MGIT™ 320/960, que permite determinar si se ha producido un crecimiento significativo de micobacterias. Cuando esto ocurre, el instrumento informa de este crecimiento bacteriano como el momento o tiempo de detección (TTD).

El resultado positivo del cultivo MGIT™, la tinción de Ziehl Neelsen confirmando bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR+) y las pruebas de identificación rápidas positivas, son las principales herramientas para comprobar la presencia del *Complejo Mycobacterium tuberculosis* en la muestras en estudio. Además, brinda la posibilidad de realizar pruebas de susceptibilidad en medio líquido a fármacos anti-tuberculosos o el uso de este crecimiento para la detección de alteraciones genómicas por técnicas de biología molecular en el Laboratorio de Referencia Nacional (Sección Micobacterias del Instituto de Salud Pública).

La elaboración de este documento se enmarca dentro del rol del ISP y la Sección Micobacterias en fomentar y fortalecer las capacidades técnicas de la red de laboratorios en la implementación y estandarización de la metodología del cultivo líquido a nivel país.

Esta guía presenta procedimientos adicionales e instrucciones que pueden no estar incluidas en los insertos del sistema BACTEC™-MGIT™ 320/960, debe ser usada como una herramienta de referencia para procedimientos de micobacteriología.

Estas acciones de apoyo son necesarias de implementar para cumplir con el objetivo país de alcanzar la meta sanitaria de reducir la tasa de incidencia de TBC en todas las formas, así como abordar adecuadamente el estudio de pacientes MDR-TB y XDR-TB, en concordancia con lo recomendado por el Programa Nacional de Control y Eliminación de la Tuberculosis (PROCET) para todos los niveles del Sistema Nacional de Servicios de Salud del país.

III. ABREVIATURAS.

- MGIT™** Tubo de medio líquido – mycobacteria growth indicator tube.
- PANTA** Suplemento antimicrobiano que contiene: Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico, Trimetropina y Azlocilina.
- UC** Unidad de crecimiento
- OMS** Organización Mundial de la Salud.

OPS	Organización Panamericana de la Salud.
LJ	Medio Lowenstein Jensen.
EPP	Elemento de protección personal.
PROCET	Programa de control y eliminación de tuberculosis.
TB	Tuberculosis.
MDR	Multidrogorresistente.
XDR	Extremadamente-drogorresistente.
SR	Sintomático respiratorio.
IAL	Infecciones Adquiridas en Laboratorio.
CAH	Cambios Aire Hora.
GBS	Gabinete de Bioseguridad/ Cabina de Bioseguridad.
HEPA	Filtro de partículas de alta eficiencia.
ZN	Tinción de Ziehl Neelsen.
ID	Identificación mediante inmunocromatografía.
BAAR	Bacilo ácido alcohol resistentes.
LPA	Prueba por sondas genéticas, por sus siglas en inglés.
WRD	Diagnóstico rápido aprobado por la OMS.

IV. DESARROLLO.

1. PRINCIPIO DEL CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO.

El medio líquido contiene caldo Middlebrook 7H9 modificado, al que se agrega el suplemento de crecimiento MGIT™, con esto se logran las condiciones ideales para que se multipliquen la mayoría de las micobacterias, mientras que las bacterias contaminantes son inhibidas por la adición de una mezcla de antibióticos. El crecimiento de bacterias, incluyendo micobacterias, se detecta por la emisión de fluorescencia del tubo, la que aumenta proporcionalmente a medida que las bacterias utilizan el oxígeno y lo reemplazan con dióxido de carbono en el medio.

El equipo mide la fluorescencia en el tubo al ser expuesto a luz ultravioleta (UV), con esta lectura se realizan los algoritmos informáticos que interpretan automáticamente los resultados, en el momento que se alcanza un desarrollo bacteriano de aproximadamente 10^5 - 10^6 UFC (Unidades formadoras de colonia) por ml de medio, los tubos son interpretados como positivos. Al cumplir 42 días de incubación sin desarrollo, el equipo lo interpreta como un cultivo negativo.

Para el aislamiento primario de micobacterias, se pueden procesar diferentes tipos de muestra, tanto pulmonares como extrapulmonares. Las muestras a procesar son principalmente pulmonares (expectoración, esputo) y muestras extrapulmonares: pus y otras muestras mucopurulentas; aspirados gástricos, lavados bronquiales, hisopados de laringe, tejidos, fluidos corporales asépticos como líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido sinovial y el líquido pleural.

Los ensayos clínicos realizados por BD™ con muestras de orina no han permitido validar la técnica, debido a que en la mayoría de las muestras de este tipo, las bacterias se encuentran en una muy escasa cantidad, pero existen estudios externos que muestran resultados exitosos utilizando medio MGIT™ para

aislar micobacterias en orina. Las muestras de sangre no son adecuadas para el sistema MGIT™.

Antes de inocular las muestras en el medio de cultivo líquido y sólido, se debe realizar un procedimiento estándar de digestión y descontaminación de las muestras, ya sea por el denominado Método de N-acetil-L-cisteína (NaOH-NaLC) o por el Método de Petroff.

Las muestras ya procesadas se inoculan en tubos MGIT de 7 ml, complementado con suplemento de crecimiento, MGIT™ OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y una mezcla de antibióticos PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ácido Nalidíxico, Trimetropina y Azlocilina).

Los tubos MGIT contienen un compuesto fluorescente embebido en la base de silicona del tubo (fluorocromo, tris 4, 7-difenil-1, 10-fenontrolina pentahidrato de cloruro de rutenio). Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno presente apaga las emisiones del compuesto y se detecta poca fluorescencia. Las bacterias presentes en las muestras metabolizan este oxígeno, producto de esto, se puede detectar el aumento en la fluorescencia.

Los procesos de descontaminación deben ser respetados en forma rigurosa, ya que altas concentraciones de N-acetil L-cisteína (NALC) o Hidróxido de sodio (NaOH) pueden provocar una falsa fluorescencia.

2. EQUIPO BACTEC™ MGIT™ 960.

El equipo BACTEC™ MGIT™ 960 es capaz de monitorizar un total de 960 tubos de 7 ml de MGIT™. Los tubos están dispuestos en tres cajones, que funcionan como incubadoras, de forma continua, etiquetados como A, B, y C, cada uno de los cuales tiene capacidad de hasta 320 tubos. El equipo MGIT™ 320 consta de sólo un cajón con capacidad de 320 tubos, de ahí los nombres MGIT™ 960 o 320.

Figura 1.

Equipo MGIT™ 960.



Los cajones de incubación de tubos del Equipo MGIT™ 960 contienen los siguientes elementos:

- a. Soporte de tubos:** Estante en el cajón que contiene los tubos MGIT™.

Figura 2.
Soporte de tubos MGIT™.



b. Estaciones: Pocillos individuales en el bastidor en el que se insertan los tubos MGIT™.

Figura 3.
Estaciones de Trabajo.

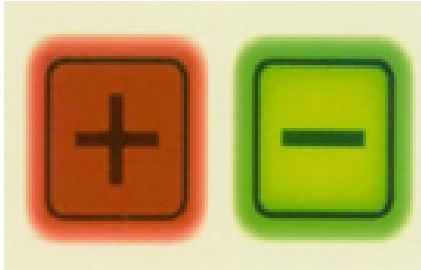


c. Unidad de detección: Se ubica debajo de la rejilla y cuenta con 16 detectores, uno para cada fila de estaciones. La unidad se mueve de izquierda a derecha y viceversa, tomando lecturas de la prueba para cada una de las 20 columnas de la estación y el tubo calibrador.

d. Indicadores de estado del cajón: tres lámparas ubicadas en la parte frontal de cada cajón; uno indica un valor positivo (+), uno indica un valor negativo (-), y uno indica un error de la estación (!).

Figura 4.

Indicadores de estado de cajón.



- e. **Escáner de código de barras:** situado en la parte delantera del equipo; que se utiliza para escanear las etiquetas para tubos de muestra de identificación. El escáner se enciende automáticamente.

Figura 5.

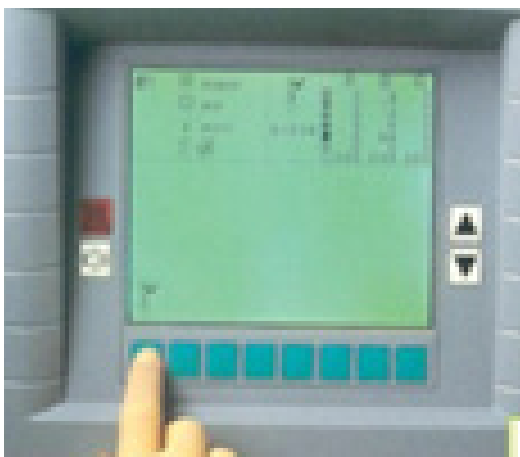
Escáner de código de barras.



- f. **Pantalla LCD y teclado:** presenta toda la información necesaria para supervisar el estado del equipo y de la estación, para ingresar y retirar los tubos, preparar el equipo, imprimir informes, y realizar el mantenimiento de rutina del equipo.

Figura 6.

Pantalla LCD y teclado.



3. FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO MGIT™.

El equipo lee cada 60 minutos todos los tubos que se encuentren en los cajones. Para esto una fila de LEDs, ubicados por debajo de los tubos, se ilumina y activa los sensores de fluorescencia. Los cultivos positivos se avisan inmediatamente por una luz indicadora (+) en la parte delantera del cajón (y una alarma audible opcional) que se visualizan en la pantalla LCD.

Cuando los tubos son identificados como positivos, deben ser retirados del equipo para la confirmación de resultados de acuerdo a los procedimientos establecidos.

a. DEFINICIÓN DE UNA UNIDAD DE CRECIMIENTO (UC).

La unidad de crecimiento (UC, GU en inglés), es una medida algorítmica derivada del sensor de fluorescencia, producto de la diferencia de la señal óptica producida por el cambio de voltaje o tensión de fluorescencia basal realizada al ingresar un tubo MGIT™ en el equipo.

El MGIT™ 960 realiza una lectura cada hora. Un tubo “con lectura positiva” es señalado de forma automática a través de algoritmos internos cuando la UC alcanza o supera el valor de corte de 75 unidades. Este valor se identifica como un verdadero positivo, y se confirma mediante pruebas adicionales tales como Tinción ZN y técnicas de identificación rápida (inmunocromatografía).

Si el MGIT™ 960 señala un tubo como positivo y registra una UC superior a 0 y sobrepasa más allá de las 75 UC de corte antes de las 5 horas de incubación, el crecimiento se ha producido muy rápido. En una representación gráfica, esta curva de crecimiento sería muy empinada, en comparación con la curva progresiva generada por el verdadero positivo. Si se ha producido un crecimiento explosivo, el software registra una T en la columna de crecimiento, por lo general, significa que el tubo MGIT™ está contaminado. La contaminación será confirmada por una prueba de ZN negativo y se recomienda además subcultivar en agar sangre para confirmar la contaminación.

La unidad de crecimiento (UC) no es una indicación de la biomasa dentro de un tubo de cultivo. Un tubo MGIT™ que ha sido marcado como positivo por lo general contiene una biomasa de aproximadamente 10^5 a 10^6 UFC / ml. Sin embargo, el tubo puede dar una señal positiva aun cuando las UFC son demasiado bajas para producir una tinción de ZN positivo. Por lo tanto, no hay una correlación directa de la biomasa y la UC en el momento de la detección de positividad en el equipo.

b. RUTINA DIARIA DE INICIO MGIT™.

Todos los días, preferentemente antes de cargar o descargar tubos en el Equipo MGIT™ 960, se debe realizar un chequeo de todas las funciones claves del equipo, que son el indicador de lámpara externa, lámpara indicadora del cajón y termómetros internos, como se describe paso a paso en los cuadros resumen que siguen:

Funciones	Instrucciones
Verificación de indicador de lámpara externa	<ol style="list-style-type: none"> 1. Cerrar todos los cajones 2. Presione suavemente la tecla < mantención> (maintenance). 3. Presione suavemente la tecla < indicadores de pruebas> (test indicators). 4. Presione suavemente la tecla < Test Indicadores de cajones > (test drawer indicator), para apagar los LEDs. 5. Las tres luces indicadoras externas en los tres cajones deben encenderse, así como el indicador de alarma del equipo. 6. Anote este chequeo en el Registro de mantenimiento del equipo MGIT™.
Verificación de la lámpara indicadora del cajón	<ol style="list-style-type: none"> 7. Abra el cajón A. Pulse suavemente la tecla < test LEDs verdes> (test green LEDs) 8. Todos los LED verdes en todas las estaciones deberán iluminarse. Si alguno no lo hace, usted debe bloquear la estación (es). 9. Vuelva a presionar suavemente < test LEDs verdes > (test green LEDs) para apagar los LEDs verdes. 10. Pulse la tecla < test LEDs Rojas> (test red LEDs). 11. Todos los LEDs rojos en todas las estaciones deberán iluminarse. Si alguno no lo hace, usted debe bloquear la estación (es). 12. Pulse suavemente la tecla < test LEDs rojos > (test red LEDs) de nuevo para apagar los LEDs rojos. 13. Repita los pasos 1-6 para cajones B y C. 14. Grabar este control de funcionamiento en el registro de mantención del MGIT™.
Verificación de temperatura	<ol style="list-style-type: none"> 15. Compruebe las lecturas de temperatura de los termómetros internos situados en cada cajón. 16. Desde la pantalla principal de estado, pulse suavemente la tecla < temperatura (temperature)> para acceder a las lecturas de temperatura del cajón. 17. Compruebe que la temperatura del cajón se encuentra actualmente dentro de +/- 1,5 ° C de la lectura manual para cada uno de los cajones. 18. Registrar las temperaturas manuales e equipos de los cajones en el registro de mantención del MGIT™.

C. MANTENCIÓN DEL FILTRO EQUIPO MGIT™.

La mantención del filtro de aire del equipo MGIT™ se debe realizar mensualmente, como se describe paso a paso en el cuadro resumen que sigue:

Funciones	Instrucciones
Mantención del filtro	<ol style="list-style-type: none"> 1. Retire la placa frontal sujetándolo por el borde inferior en los agujeros para los dedos. Suavemente pero con firmeza tire hacia fuera. 2. Retirar el filtro y lavar con agua. 3. Secar bien con toallas de papel y volver a colocar en el equipo. 4. El corte en la placa frontal debe rodear el interruptor on/off. Presione firmemente hacia el equipo. La placa frontal encajará en su lugar. 5. Grabar este procedimiento en el registro de mantención del MGIT™ el día en que fue realizado.

4. PROCEDIMIENTO PARA EL CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO.

Para el aislamiento primario de micobacterias en medio líquido, se pueden procesar muestras pulmonares y extrapulmonares. Las muestras pulmonares mucoides (esputo por expectoración) contienen una importante cantidad de bacterias contaminantes de la microbiota, por lo que es necesario realizar el procedimiento de descontaminación estandarizado por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias en procesamiento y siembra de muestras para cultivo de micobacterias, denominado Petroff modificado.

En el caso de muestras como fluidos corporales o biopsias que son recolectados en forma aséptica, aunque se deben considerar estériles, se recomienda que también sean descontaminados, esto, por la dificultad que presenta confirmar la mantención de condiciones esterilidad en todo el proceso de recolección, transporte y almacenamiento.

a. RECONTITUCIÓN DEL MGIT™ PANTA.

- Reconstituir el liofilizado MGIT™ PANTA con 15 ml de suplemento de MGIT™, ambos disponibles en el mismo kit.
- Esta mezcla es estable durante 5 días si se almacena entre 2°-8° C

b. INOCULACIÓN DE TUBOS MGIT™.

Antes de usar, examine todos los tubos MGIT™ para ver si hay evidencia de contaminación o daño, ya que éstos no son adecuados para su uso. La inoculación de los tubos MGIT™ debe realizarse dentro de un gabinete de bioseguridad, de acuerdo a las indicaciones emanadas en la Guía de Bioseguridad en el diagnóstico de la tuberculosis para Laboratorios, 2017, Capítulo 2.

Es necesario respaldar el cultivo líquido con un cultivo sólido que servirá para evidenciar la morfología de las colonias, descartar contaminación o mezclas de micobacterias. Se debe esperar tener el resultado del estudio de susceptibilidad en medio líquido para evaluar si se puede eliminar este respaldo.

Instrucciones:

- Etiquetar o enumerar el tubo MGIT™ con el número asignado por el laboratorio o su código de barra. Registre el número asignado al tubo MGIT™ en el libro de registro del laboratorio manual o informático.
- Añadir 0,8 ml de la mezcla PANTA/suplemento a cada tubo MGIT™ utilizando una pipeta graduada estéril de 1 ml, teniendo cuidado de no contaminar los tubos.
- Utilizando una pipeta graduada estéril de 1 ml, añada 0,5 ml de muestra tratada al tubo MGIT™. Des-eché la pipeta en el contenedor de residuos biológicos.
- Cierre firmemente el tubo MGIT™ y mezcle bien invirtiendo suavemente varias veces.
- Sembrar un respaldo en medio Lowenstein Jensen añadiendo 0,5 ml de muestra e incubar en estufa de cultivo a 37°C +/-1° de acuerdo a lo recomendado por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias, realizando la **lectura semanal del cultivo sólido**.

c. INTRODUCCIÓN DE LOS TUBOS EN EL EQUIPO MGIT™.

Introduzca los tubos en el equipo tan pronto como sea posible, escaneando el código de barras del tubo MGIT™; así el equipo asignará automáticamente la posición correspondiente, como se describe paso a paso en el cuadro resumen que sigue:

Funciones	Instrucciones
Ingreso de muestras	<ol style="list-style-type: none"> 1. Abra el cajón deseado. 2. Presione la tecla <entrada de tubo>. 3. Coloque el tubo en el bloque de alineación delante del escáner con el código de barras del tubo. Gire el tubo si es necesario. El equipo emite una señal sonora para indicar que el tubo fue escaneado. 4. La posición asignada se muestra en la pantalla (junto con la secuencia de números). Además, la estación asignada para el ingreso del tubo se ilumina de color VERDE. 5. Colocar cuidadosamente y completamente el tubo en la posición apropiada. 6. Repita los pasos 1-5 para cada tubo. 7. Cuando termine, cierre el cajón o presionar <salida (exit)> para continuar con la siguiente tarea.

NOTAS:

- El equipo MGIT™ registrará la fecha de entrada de cada tubo.
- No gire los tubos después de colocarlos en la estación.
- No retire los tubos fuera del protocolo a menos que sean positivos o negativos (negativos a los 42 días).

d. INCUBACIÓN DE TUBOS MGIT™.

Dado que el sistema MGIT™ se incuba y se monitoriza continua y automáticamente, una vez que se colocan los tubos en una estación, no hay necesidad de retirarlos del equipo.

Los cultivos permanecen en sus estaciones, hasta que se señala como “positivo”, o si no se detecta crecimiento después de 42 días de incubación, se señala como “negativo”. Si se determina en el equipo que un tubo es positivo, y el frotis es negativo para micobacterias, el tubo puede volver a entrar en el equipo dentro de las 5 horas siguientes a su extracción. Si el tubo es devuelto al equipo dentro de las 5 horas (mediante

la operación <introducción de los tubos> descrita anteriormente), las rutinas de lectura son restablecidas, se mantiene el inicio de la fecha de incubación y se reanuda la monitorización del tubo. Si el tubo no se devuelve dentro de la ventana de reentrada de 5 horas, los datos asociados se eliminan de la base de datos del equipo y el tubo se monitorizará como un tubo recién introducido.

5. TRATAMIENTO DE RESULTADOS.

a. TRATAMIENTO DE LOS TUBOS NEGATIVOS.

Los cultivos negativos existen como “negativos en curso” mientras están en el período de incubación de 42 días de rutina.

A continuación aparece un recuento del número de cultivos negativos para cada cajón en la región de resumen del menú de la pantalla principal, al lado del icono circular.

Cuando no se detecta crecimiento después de 42 días, se muestra el indicador de tubo negativo, marcado con un signo menos (-) y situado en el centro de los tres indicadores del cajón, este se ilumina de color **VERDE**.

El indicador permanece encendido hasta que todos los tubos negativos se eliminan, esto se realiza a través de la operación <remover tubos negativos o remove negative tubes >. Así, los tubos se pueden extraer mediante la operación de “lotes (batch)” o “tubos únicos (single tube)”, como se describe paso a paso en el cuadro resumen que sigue:

Funciones	Instrucciones
Eliminar cultivos negativos (eliminación de todos los cultivos negativos finales del equipo sin tener que escanear los códigos de barras individuales del tubo)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Abra el cajón donde esté encendida la luz VERDE. 2. Presione <remover los tubos negativos>. 3. Presione <remover lote negativo>. El escáner de códigos de barras se apaga y los tubos no pueden ser escaneados. 4. Las estaciones con tubos negativos se iluminan con luces verdes parpadeantes. Retire todos los tubos en las estaciones verdes parpadeantes antes de cerrar el cajón. Si los tubos negativos permanecen en el cajón después de que esté cerrado, el equipo registrará estos tubos como tubos recién introducidos. Comience por delante del cajón y retírelo en orden secuencial colocándolo en el mismo orden en una gradilla. 5. Cuando se eliminen todos los negativos, presione la tecla <ok>. 6. Cuando se hayan eliminado todos los negativos, el equipo emitirá un alarma sonora 3 veces, la luz indicadora del cajón VERDE se apaga, el escáner de código de barras se apaga y el icono <ok> aparece en la pantalla de visualización. 7. Cierre suavemente el cajón o pulse salida <exit> para continuar con la siguiente tarea. Repita los pasos para otros cajones que indiquen tubos negativos.
Eliminar tubo único negativo (cada tubo negativo eliminado debe ser escaneado por el escáner de código de barras)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Siga los pasos 1-2, como se indica más arriba. 2. Las estaciones con tubos negativos se encienden con las luces verdes parpadeantes y el código de barras se enciende. 3. Al retirar cada tubo negativo, la etiqueta del código de barras debe ser escaneada antes de quitar el siguiente tubo. El equipo emitirá una alarma sonora indicando que el tubo correcto fue escaneado. El LED de la estación vacía se apaga. 4. Coloque el tubo en una gradilla en el orden secuencial de extracción. 5. Siga retirando los tubos deseados y escanee sus etiquetas de código de barras. 6. Siga los pasos 6 a 7 anteriores.

NOTA:

- Inspeccione visualmente todos los tubos negativos antes de desecharlos. Cualquier tubo que provoque sospecha de crecimiento debe ser procesado.

b. TRATAMIENTO DE LOS TUBOS POSITIVOS.

El indicador de tubo positivo es el que está a la izquierda de los tres indicadores del cajón, con un signo (+) y se ilumina en **ROJO** para informar la detección de uno o más tubos positivos, además, existe una alarma sonora opcional. El indicador permanece encendido hasta que todos los tubos positivos se eliminan a través de la operación “Quitar tubos positivos” <Remove positive tubes >, como se describe paso a paso en el cuadro resumen que sigue:

Funciones	Instrucciones
Quitar Tubos Positivos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Presione <silencio alarma> para silenciar la alarma audible (si la alarma está activada). 2. Abra el cajón con la luz positiva ROJA iluminada. 3. Presione la tecla de función: Quitar tubos positivos o remove positive tubes>. 4. Todos los tubos positivos se indicarán con las luces intermitentes VERDE y ROJO en cualquiera de los cajones. 5. Retire un tubo a la vez. Escanee la etiqueta del código de barras del tubo positivo. Gire el tubo si es necesario. 6. Las luces VERDE y ROJA se apagarán. 7. Coloque el tubo en una gradilla para transporte. 8. Repita los pasos 4 a 7 para retirar los tubos positivos adicionales, colocándolos en orden en la gradilla. 9. Cuando se hayan retirado todos los tubos positivos, el equipo emitirá tres señales, la luz indicadora del cajón se apaga, el escáner de código de barras se apaga y el icono <ok> aparece en la pantalla.

NOTAS:

- El equipo MGIT™ registrará la fecha en que el tubo se mostró positivo y el número de días / horas que se tomaron para alcanzar la positividad (TTD).
- Realizar ZN a todos los tubos positivos del equipo
- En el caso de un tubo roto en el equipo, cierre el cajón y apague el equipo. Vacíe la habitación y siga las instrucciones de bioseguridad y limpieza descritas en su laboratorio para los casos de derrame biológico.

c. REALIZACIÓN DE TINCIÓN ZIEHL-NEELSEN DESDE MEDIO LÍQUIDO.

Los tubos que se señalan como positivos en el equipo MGIT requieren un análisis adicional para determinar el tipo de crecimiento. La presencia/ausencia de BAAR en el tubo se evidencia por la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN). Los tubos deben ser revisados visualmente. El crecimiento del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, se distingue por la formación de flóculos con escasa turbidez, mientras que el crecimiento bacteriano contaminante tiene un aspecto turbio. Ver Figuras 7 y 8.

Figura 7.

Flóculos característicos de CMTBC.



Figura 8.

Cultivo turbio por contaminación.



El trabajo con tubos MGIT™ positivos debe realizarse dentro del GBS, utilizando los elementos de protección personal pertinentes, de acuerdo a lo indicado en la “Guía de Bioseguridad en el diagnóstico de tuberculosis para laboratorios, 2017”.

Ante la sospecha de contaminación en el medio líquido o como control de calidad, se recomienda sembrar placas agar sangre para visualizar colonias contaminantes (las placas se pueden dividir en 4 cuadrantes, de modo que se pueden sub-cultivar cuatro muestras en una placa).

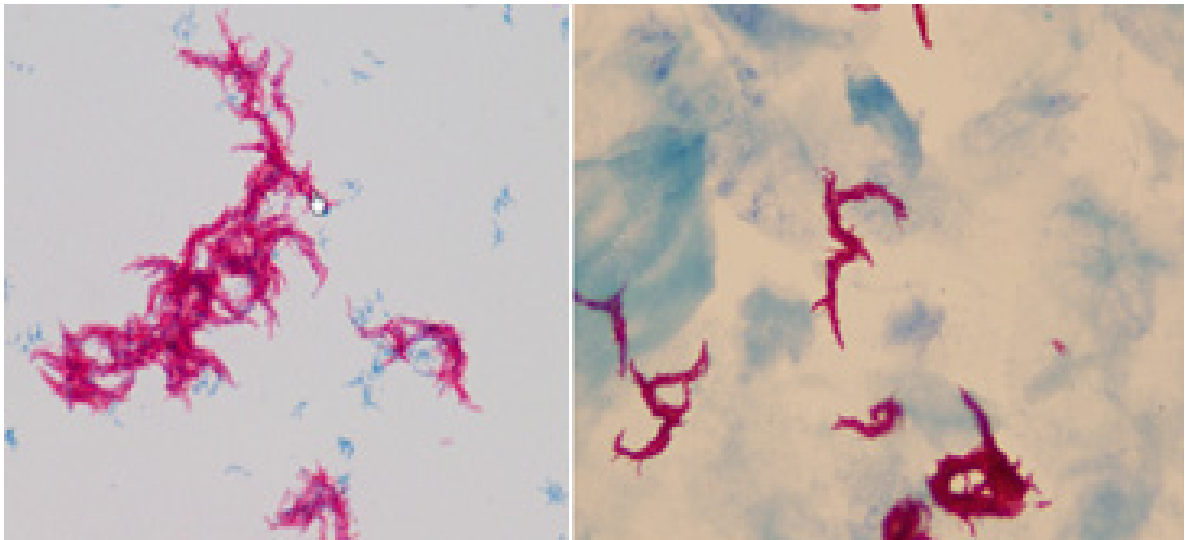
La lámina para la tinción ZN y la placa de agar sangre deben ser rotuladas con el número asignado por el laboratorio, teniendo el máximo cuidado de no confundir las inoculaciones y el etiquetado.

i. PROCEDIMIENTO DE LA TINCIÓN.

- 1) Agitar el tubo MGIT™ por inversión manual, dejar reposar y retirar la tapa cuidadosamente del tubo (para evitar generación aerosoles).
- 2) Tomar una alícuota de cultivo líquido usando una pipeta Pasteur estéril desechable. Retirar aproximadamente 200µl de cultivo (~4gotas) e inocular 2 gotas en la placa de agar sangre y 2 gotas en una lámina. Utilice un lápiz de cera o láminas con círculos grabados para ayudar a contener el contenido del frotis. Deseche la pipeta de transferencia en el recipiente de descarte de riesgo biológico.
- 3) Existe la posibilidad de volver a introducir el tubo MGIT™ en el equipo dentro de las 5 horas siguientes a la extracción, para asegurarse de que los resultados del cultivo original se conservan en la base de datos del equipo.
- 4) Realice la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) como se describe en los manuales del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias. Examine el frotis de ZN para determinar la presencia de BAAR. Si se presenta el factor cordonal, anote la descripción y el resultado del frotis en la hoja de trabajo del laboratorio.

Figura 9.

Factor cordonal cultivo líquido al microscopio x100 y x40.



- 5) Incubar la placa de agar sangre a 35 ° C ±1 °C durante 72 horas. Si no se dispone de incubación a 35 ° C, incubar a 37 °C. Se prefiere la temperatura más baja ya que dificulta el crecimiento de contaminantes.

ii. PRECAUCIONES.

- Una de las principales fuentes de contaminación en el medio MGIT™ son los contaminantes ambientales introducidos durante la adición del suplemento de crecimiento.
- Haga todas las adiciones en una cabina de bioseguridad.
- No abra muchos tubos al mismo tiempo.
- Mantener abierto el tubo MGIT™ durante períodos de tiempo lo más cortos posible.
- Prefiera una pipeta de repetición al agregar el suplemento de crecimiento.

- Vuelva a tapar siempre el tubo firmemente. Si la tapa se deja suelta, puede afectar la detección de fluorescencia.
- Volúmenes superiores a 0,5 ml de muestra descontaminada pueden alterar el pH del medio y pueden causar fluorescencia falsa. Esto también puede aumentar la contaminación o afectar adversamente el rendimiento del medio MGIT™.

d. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS MGIT.

Los estudios con resultados positivos, deben ser retirados del equipo y seguir con las siguientes actividades complementarias antes de emitir el informe final:

i. DETECCIÓN DE CRECIMIENTO POSITIVO.

Una vez retirado el tubo positivo del equipo, este debe ser observado visualmente. El crecimiento micobacteriano aparece granular con flóculos (pequeños y/o grandes) no muy turbio, mientras que el crecimiento bacteriano contaminante aparece muy turbio, (Figura 10). El *Complejo M. tuberculosis* tiene un desarrollo característico en la mayoría de las cepas que consiste en asentarse fuertemente en el fondo del tubo en forma de grumos compactos.

El equipo permite recuperar información sobre el tiempo de detección (TTD), a partir de los datos que mantiene el sistema en los informes de tubos positivos descargados. Este tiempo depende de varios factores, tales como:

- El número de BAAR viables inoculadas en el tubo MGIT™;
- La especie de las micobacterias, como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, que crecen más lentamente que las micobacterias no tuberculosas (MNT) como el complejo *M. avium*;
- El tipo de muestra: aquellas provenientes de sitios extrapulmonares, suelen tardar más tiempo en dar señal positiva, debido al menor número de BAAR presentes en este tipo de muestras;
- El estado del tratamiento de los pacientes también juega un papel importante. Las muestras de pacientes tratados crónicamente con tuberculosis resistente a fármacos, tardan más tiempo en crecer;
- El procesamiento de la muestra que influye también en la positividad: los cambios de pH que se realizan en las diferentes etapas de descontaminación, someten a la preparación a un pH alto o un pH muy bajo, ambas situaciones pueden causar inhibición del metabolismo bacteriano o la muerte de las micobacterias presentes. Por lo tanto, la reactivación y el crecimiento de micobacterias viables toma más tiempo. En algunos casos, durante el proceso pueden significar la muerte entre el 60-70% de las micobacterias.
- La pérdida de micobacterias durante la centrifugación también es significativa. Si la centrifugación genera calor, acelerará la muerte de micobacterias durante este proceso. Una velocidad de centrifugación insuficiente puede no lograr la precipitación de todas las micobacterias en el sedimento, ya que las micobacterias, que son hidrófobas, son difíciles de concentrar. El uso de una centrífuga refrigerada soluciona el factor temperatura, y la velocidad de centrifugación precisa, el factor de la precipitación micobacteriana.
- Se ha informado que en los sistemas de cultivo líquido, la mayoría de las especies de micobacterias crecen mejor y más rápido en comparación con los medios sólidos. Esto es especialmente cierto para las micobacterias de crecimiento lento, tales como el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, particularmente los provenientes de pacientes tratados. El *Mycobacterium avium*, que es una micobacteria no tuberculosa (MNT) de crecimiento lento en medio sólido, crece mucho más rápidamente en medio líquido.

Figura 10.

Medio líquido transparente con flóculos (CMTBC).



En algunos casos, especialmente si el crecimiento micobacteriano es extremadamente lento o hay menos consumo de oxígeno, este desarrollo puede darse sin la presencia de fluorescencia. Se recomienda que al final del protocolo de incubación, todos los tubos negativos se examinen visualmente para confirmar la turbidez y el crecimiento antes de descartar. Si hay alguna sospecha de desarrollo, debe hacerse un frotis para BAAR y subcultivos. Esto elimina las posibilidades de reportar falsos negativos. Si los resultados del MGIT™ no son satisfactorios debido a una recuperación deficiente, retraso en la detección o alta tasa de contaminación, siga las instrucciones para la solución de problemas en el punto: **REDUCCIÓN DE TASAS DE CONTAMINACIÓN** (Ver página 23, letra c de esta guía). El control de calidad para los reactivos y productos utilizados en el aislamiento, así como para el procedimiento de las pruebas, es de importancia crítica para los laboratorios de micobacteriología.

ii. VERDADEROS POSITIVOS PARA CMTBC.

Para definir el desarrollo obtenido como un verdadero positivo, se deben cumplir los tres parámetros presentados en el siguiente cuadro.

Frotis con tinción de Ziehl Neelsen	Test inmunocromatográfico (TIC)	Observación Macroscópica
Se observan bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR Positivo), sin contaminación. Se observan agrupados o con factor Cordonal.	Positivo.	Se observa medio líquido con flóculos característicos de CMTBC.

Se debe derivar el cultivo en estudio al Laboratorio de Referencia (ISP) para estudio de susceptibilidad. El informe de resultado debe contener la siguiente información:

“Cultivo líquido positivo para Complejo *M. tuberculosis*”

Tiempo de detección a los.....días.

iii. SOSPECHA DE MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSAS (MNT).

Para definir el desarrollo obtenido como sospecha de micobacterias no tuberculosas, se deben usar los resultados de los tres parámetros presentados en el siguiente cuadro y realizar las acciones posteriormente descritas.

Frotis con tinción de Ziehl Neelsen	Test inmunocromatográfico (TIC)	Observación Macroscópica
Se observan bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR Positivo), sin contaminación. Se observan al frotis generalmente aislados.	Negativo.	Se observa medio líquido flóculos finos o turbidez. Sin flóculos característicos de CMTBC.

Para descartar micobacterias de desarrollo lento o escasa cantidad de bacilos viables, incubar a 37°C por 48 horas, luego, repetir test inmunocromatográfico.

Se pueden obtener los siguientes resultados:

- Resultado de repetición de prueba inmunocromatográfica (TIC) Positivo:
El informe de resultado debe contener la siguiente información:
“Cultivo líquido positivo para Complejo *M. tuberculosis*.”
Tiempo de detección a los.....días.
- Resultado de repetición de prueba inmunocromatográfica (TIC) Negativo:
El informe de resultado debe contener la siguiente información:
“Cultivo líquido positivo para bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR positivo), se envía a ISP para identificación de especie.”

iv. TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN POSITIVO MÁS CONTAMINACIÓN.

Para definir el desarrollo obtenido con presencia de bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR Positivo) y microbiota asociadas, se deben cumplir los tres parámetros presentados en el siguiente cuadro y realizar las acciones posteriormente descritas.

Frotis con tinción de Ziehl Neelsen	Test inmunocromatográfico (TIC)	Observación Macroscópica
Se observan bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR Positivo), y otras estructuras bacterianas y/o levaduras y/o hifas.	No Realizar.	Se observa generalmente turbidez con o sin presencia de flóculos característicos de CMTBC.

Se debe derivar el cultivo en estudio al Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (ISP) para aislar la cepa en estudio y posteriormente identificar la especie de micobacteria. Ante la posibilidad que técnicamente no sea factible poder aislar las micobacterias de los contaminantes, se debe solicitar nueva muestra para asegurar el diagnóstico del paciente.

El informe de resultado debe contener la siguiente información:

”En el desarrollo del cultivo líquido se observan bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR positivos) más contaminación, se envía a ISP para identificación de especie”.

v. CULTIVO TUBO MGIT™ CONTAMINADO.

Para confirmar que el desarrollo obtenido corresponde sólo a microbiota contaminante, se deben utilizar los resultados de los tres parámetros presentados en el siguiente cuadro y realizar las acciones posteriormente descritas.

Frotis con tinción de Ziehl Neelsen	Test inmunocromatográfico (TIC)	Observación Macroscópica
No se observan bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR Negativo) y se pueden observar o no otras estructuras bacterianas, levaduras o hifas.	No realizar	Se observa generalmente turbidez sin presencia de flóculos característicos de TBC.

- Si el estudio dio positivo antes de los 7 días, incubar nuevamente el tubo MGIT durante otros 14 días en el equipo y repetir el frotis con tinción de Ziehl Neelsen. Esto asegura que si existe *M. tuberculosis* en baja cantidad, no se produzca un falso negativo.
 - Si la tinción de Ziehl Neelsen posterior es positivo, siga lo descrito en el paso iv.
TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN POSITIVO MÁS CONTAMINACIÓN.
 - Si la tinción de Ziehl Neelsen posterior es negativa, este tubo se confirma como contaminado y puede ser desechado.
El informe de resultado debe contener la siguiente información:
“Cultivo líquido contaminado, no se observan bacilos alcohol ácido resistentes (NSOBAAR). Se solicita nueva muestra.”
- Si el estudio dio positivo después de los 7 días, y la tinción de Ziehl Neelsen es negativo.
El informe de resultado debe contener la siguiente información:
“Cultivo líquido contaminado, no se observan bacilos alcohol ácido resistentes (NSOBAAR). Se solicita nueva muestra.”

vi. CULTIVO TUBO MGIT™ POSITIVO TEMPRANO (ANTES DE 4 DÍAS).

Si se produce desarrollo de positividad antes de los cuatro días de incubación, corresponde a un desarrollo no característico, por lo que se deben utilizar los resultados de los tres parámetros presentados en el siguiente cuadro para realizarlo y además será necesario buscar correspondencia con resultado de baciloscopía (BK), cuando esta es positiva de alta carga bacilar (+++), obtener un desarrollo antes de los 4 días es aceptable.

Frotis con tinción de Ziehl Neelsen	Test inmunocromatográfico (TIC)	Observación Macroscópica
Se observan bacilos alcohol ácido resistentes, sin contaminación. Se observan agrupados o con factor Cordonal.	Positivo.	Se observa medio líquido con flóculos característicos de CMTBC.

- Si en la tinción de Ziehl Neelsen se observan bacilos alcohol ácido resistentes con TIC positivo y flóculos característicos. El informe de resultado debe contener la siguiente información:
“Cultivo líquido positivo para Complejo *Mycobacterium tuberculosis*”.

Tiempo de detección a los.....días.

Frotis con tinción de Ziehl Neelsen	Test inmunocromatográfico (TIC)	Observación Macroscópica
No se observan bacilos alcohol ácido resistentes ni microbiota contaminante.	No Realizar	No se observa turbidez o presencia de flóculos característicos de CMTBC.

1. Si en la tinción de Ziehl Neelsen no se observan bacilos alcohol ácido resistentes y no se observa contaminación al frotis, reincubar hasta los 42 días e informar.

El informe final a los 42 días con cultivo negativo debe contener la siguiente información:

“Cultivo líquido negativo. No hubo desarrollo de BAAR a los 42 días de incubación”.

Frotis con tinción de Ziehl Neelsen	Test inmunocromatográfico (TIC)	Observación Macroscópica
Se observan bacilos alcohol ácido resistentes, sin contaminación. Se observan al frotis generalmente aislados.	Negativo.	Se observa medio líquido sin flóculos característicos de TBC, flóculos finos o turbidez.

1. Si es tinción de Ziehl Neelsen positivo y el test inmunocromatográfico (TIC) es negativo enviar a ISP para identificación de especie.

El informe de resultado debe contener la siguiente información:

“Cultivo líquido positivo para BAAR, se envía a ISP para identificación de especie.”

2. Si el estudio dio positivo con tinción de Ziehl-Neelsen negativo, antes de los 4 días, la primera acción es informar “Estudio contaminado, se solicita nueva muestra”. Es necesario tomar la precaución de no eliminar el tubo, reincubar éste en el equipo por 14 días más, luego repetir la tinción de Ziehl-Neelsen y si este es positivo seguir lo indicado en paso iv. TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN POSITIVO MÁS CONTAMINACIÓN.
3. En casos aislados un tubo MGIT™, puede ser negativo en el equipo, pero estar positivo al frotis para BAAR y/o subcultivo. En tal caso, informe el resultado como positivo.

6. PROCEDIMIENTOS PARA LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS DE CONTAMINACIÓN.

a. CONTAMINACIÓN BACTERIANA.

La incidencia de contaminación con bacterias (distintas de las micobacterias) varía de laboratorio a laboratorio dependiendo de varios factores. Según las directrices de la CDC, una tasa de contaminación de hasta un 5% es aceptable en cultivos de muestras clínicas en medios sólidos. En general la recomendación es que el 5% +/- 2% sea aceptable para todos los tipos de medios. Sin embargo, para los medios líquidos, puede aceptarse una contaminación ligeramente mayor (hasta 7-8%). Una tasa de contaminación muy baja (menos del 3%) puede indicar un proceso de descontaminación demasiado severo, que también afectaría al crecimiento de micobacterias y podría reducir la tasa de positividad o provocar aumento en el tiempo de detección del cultivo positivo de micobacterias. Por otro lado, una mayor tasa de contaminación (por encima del 8%) puede deberse a las siguientes razones:

- Incorrecta o insuficiente descontaminación de la muestra.
- Las muestras muy mucoides que son difíciles de licuar pueden resultar con alta contaminación.
- Tiempo de almacenamiento y transporte de la muestra muy largo después de la recolección. En tales situaciones, especialmente a temperaturas altas, las bacterias tienden a crecer demasiado y luego son difíciles de eliminar por el procedimiento de descontaminación de rutina.
- Uso de materiales no estériles como pipetas, tubos, etc.
- A veces, si se preparan reactivos, se almacenan a granel y se utilizan durante largos períodos de tiempo, estos se pueden contaminar.

b. CONTAMINACIÓN CRUZADA.

La contaminación cruzada con micobacterias de una muestra a otra es una situación que debe ser investigada en los laboratorios de micobacteriología. Usualmente ocurre durante el procesamiento de muestras, especialmente en el momento en que se añade la solución NaOH a la muestra o se añade H₂SO₄. La generación de aerosoles o salpicaduras durante la adición causa contaminación cruzada, contaminando el siguiente tubo o la solución madre del reactivo. Tocar el borde del tubo de muestra con el recipiente de reactivo durante el vertido o la adición del reactivo también puede producir un alto porcentaje de las contaminaciones. A veces la solución madre de un reactivo se contamina con micobacterias comúnmente encontradas en agua (*M. gordonae*, *M. xenopi*). Para reducir las posibilidades de contaminación cruzada, es recomendable alicuotar pequeñas cantidades de las soluciones. En caso de un episodio de contaminación cruzada, todos los reactivos deben ser cambiados, el equipo y los gabinetes de bioseguridad deben ser descontaminados minuciosamente en su superficie.

c. REDUCCIÓN DE TASAS DE CONTAMINACIÓN.

Para poder reducir altas tasas de contaminación durante el aislamiento de micobacterias de muestras clínicas, se recomienda revisar todos los procedimientos y asegurarse de que todos los pasos recomendados se sigan estrictamente. Si persiste un porcentaje alto de contaminación, tomar las siguientes medidas:

- Aumentar la concentración de NaOH (no más del 1,5% de concentración final extra según su técnica, en la muestra). Se sabe que el aumento de NaOH disminuye la tasa de contaminación. No aumente el tiempo de exposición durante más de 25 minutos a una solución de NaOH.

- Aumentar la concentración de PANTA, esto se puede lograr reconstituyendo con un volumen menor del suplemento de crecimiento. Sin embargo, el aumento de la concentración de PANTA debe ser cuidadosamente evaluado, ya que una mayor concentración de algunos antimicrobianos presentes en PANTA puede afectar negativamente al crecimiento de algunas especies de micobacterias distintas de *Complejo M. tuberculosis*. En lugar de 15,0 ml, utilizar 10,0 ml para reconstituir PANTA. Añadir el volumen regular de 0,8 ml en el tubo MGIT.
- No cambie la concentración de NaOH y PANTA al mismo tiempo. Pruebe un procedimiento a la vez y documente la mejora de resultados.
- Si parece haber una fuente común de bacterias contaminantes (el mismo tipo de bacterias que contaminan repetidamente), verifique la esterilidad de todos los reactivos. Es una buena práctica dispensar pequeñas cantidades de reactivos y utilizar sólo uno a la vez. Los restos deben ser desechados o reesterilizados.
- Trate de reducir el tiempo entre la recolección de muestras y su procesamiento. Si necesita almacenar una muestra use refrigeración.
- Transporte la muestra con hielo y en un contenedor aislante, especialmente cuando hace calor.
- Invertir el tubo durante el proceso de descontaminación ayuda a descontaminar la superficie interior de la parte superior del tubo.
- Si existe un problema persistente de contaminación por *Pseudomonas*, se sabe que el procedimiento con ácido oxálico es el más eficaz para matar estas bacterias. Sin embargo, no ha sido validado para MGIT™. La azlocilina en PANTA es muy eficaz en la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas*, por lo tanto el aumento de la concentración de PANTA puede ayudar.

7. CONTROL DE CALIDAD.

El Instituto de Salud Pública de Chile ha elaborado esta guía con medidas de control de calidad de los medios MGIT™, del equipo MGIT™, de la técnica de cultivo y de los datos de laboratorio, con la finalidad de sugerir un proceso normalizado para el control de calidad interno de acuerdo a las instrucciones del fabricante y la experiencia adquirida como Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias.

Lo anterior, como una forma lograr una mejora continua y uniforme de la calidad de las prestaciones de los laboratorios clínicos del país. La disponibilidad de herramientas que permiten planear y controlar la calidad analítica de los exámenes asegura la liberación de resultados útiles para el diagnóstico clínico.

a. CONTROL DE CALIDAD DE LOS MEDIOS MGIT™.

Implementar control de calidad interno para medios de cultivo, donde se registre las siguientes actividades:

1. Aspecto: transparente, turbio.
2. Tubos: si se observan rotos o con menos cantidad de medio de cultivo.
3. Esterilidad: Incubar una muestra de cada nuevo lote a 37°C +/-2°C durante 48 horas y luego adicionales 48 horas más a temperatura ambiente. En ninguna de las dos incubaciones debe observarse desarrollo de bacterias o micobacterias.

b. CONTROL DE CALIDAD DEL EQUIPO MGIT™.

Efectúe comprobaciones diarias funcionales y de temperatura del equipo MGIT™ y anote en el registro de mantenimiento de MGIT™. Tal como se explicó en Capítulo 3b, Rutina diaria de MGIT™.

c. CONTROL DE CALIDAD DE LA TÉCNICA DE CULTIVO.

Realizar el control de calidad interno de la técnica de cultivo de manera indirecta comparando los resultados de baciloscopía y cultivo que deben ser concordantes, es decir, una BK (+) no puede tener un cultivo negativo o con un tiempo de detección demasiado prolongado. Esto indicaría que probablemente el cultivo no está siendo bien ejecutado. Se excluye de esta situación los pacientes en control de tratamiento. Cuando se encuentra un cultivo con tiempo de detección de entre 4 a 7 días con BK (-) es fundamental el análisis y buscar causas a corregir, ya que esta situación no representa en ningún caso un aporte real del cultivo al diagnóstico de casos, sino más bien una falla en la baciloscopía.

Adicionalmente revisar el aporte del cultivo en el diagnóstico de casos, esperando encontrar en promedio de 20-40 % en los casos pulmonares. Esto debido a que el cultivo en medio líquido aporta un 10% más de sensibilidad que el medio de cultivo sólido (20-30%). Estos aportes se deben calcular por separado tanto de medio líquido y sólido, para realizar un correcto análisis del aporte de casos por tipos de medios utilizados.

d. CONTROL DE CALIDAD CON DATOS DE LABORATORIO.

Para la evaluación del desempeño general de los procedimientos de laboratorio, el análisis periódico de los resultados obtenidos de los pacientes ayuda a monitorear la eficiencia del laboratorio y establecer buenas prácticas de laboratorio. Se recomienda calcular para períodos de 6 meses las siguientes estadísticas:

Frotis	Resultado cultivo	Nº Total muestras	Promedio tiempo de detección
Frotis Positivo*	Cultivo Positivo	"n" muestras	"Nº" días
Frotis Negativo*	Cultivo Positivo	"n" muestras	"Nº" días
Frotis Positivo	Cultivo Negativo	"n" muestras	NA
Frotis Negativo	Cultivo Negativo	"n" muestras	NA
NA	Contaminación	"n" muestras	"Nº" días

* Frotis Positivo - frotis de la muestra clínica

** Cultivo Positivo – calcule tanto para MGIT™ como para cualquier otro medio utilizado, cultivo positivo confirmado con BAAR.

Si hay un cambio abrupto en cualquier categoría de datos de muestra, indicaría algún cambio en las prácticas de laboratorio o reactivos. El aumento en la tasa de contaminación indica que todos los procedimientos deben ser revisados y deben ser tomadas medidas correctivas para lograr resultados satisfactorios. Si la positividad del cultivo o el tiempo de detección en MGIT™ son similares o mayores en comparación con el medio sólido, los procedimientos deben ser reevaluados ya que se espera que el rendimiento general de MGIT™ deba ser mejor y con un tiempo menor de detección.

8. IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DEL COMPLEJO MTBC UTILIZANDO TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO.

a) PROPÓSITO.

Detectar rápidamente (<1 h) y con precisión, el *Complejo Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) en cultivos líquidos MGIT™, con frotis de bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR) positivos.

Están disponibles los test de identificación MGIT™ TBc (TBc ID) de Becton Dickinson (BD), el test TB-Neo Taus Capilia™ (Capilia) y SD bioline TB Ag MPT64 Rapid™ (Standard diagnostic S.A).

b) PRINCIPIO.

El ensayo de inmunoanálisis cromatográfico rápido se usa para identificar el *Complejo M. tuberculosis*. Los test MGIT™ TBc ID BD, TB Capilia™ de Tauns y SD bioline TB Ag MPT64 Rapid™, son ensayos de inmunocromatografía de flujo lateral. El ensayo BD y Bioline detecta el antígeno MPT64, mientras Capilia detecta el antígeno MPB64, una fracción de proteína micobacteriana específica secretada por las células del CMTB durante el crecimiento del cultivo. Cuando se añade una muestra al dispositivo de análisis, el antígeno MPT64 / MPB64 se une a anticuerpos anti-MPT64/MPB64 conjugados con partículas de visualización (oro coloidal) presentes en la tira de análisis, formando un complejo antígeno-anticuerpo.

Este complejo antígeno-conjugado migra a través de la tira de análisis a la zona de reacción, donde es capturado por un segundo anticuerpo específico MPT64 / MPB64 fijado a la membrana. Si el antígeno MPT64 / MPB64 está presente en la muestra, se produce una reacción de color gracias a las partículas de oro coloidal marcadas, lo que se visualiza finalmente con una línea que va desde un color rosa (o violeta) a roja. Se incluye un control positivo interno para validar el rendimiento de la prueba.

La prueba detecta las siguientes especies de complejo MTBC:

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*.

En una serie de estudios clínicos realizados con estos test han demostrado tener una alta sensibilidad (> 95%) y especificidad (> 95%).

c) PROCEDIMIENTO Y RECOMENDACIONES.

Los laboratorios que dispongan de medios sólidos para el aislamiento, la identificación de *M. tuberculosis* es a través de la morfología característica de sus colonias. Si presenta una morfología no característica, se requiere una confirmación por parte de la Sección Micobacterias del ISP.

No es recomendable la realización de test inmunocromatográfico a partir de medios sólidos en laboratorios nivel 2 de bioseguridad, por el riesgo que representa la manipulación y disgregación en el nivel local.

i. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

La preparación de muestras y pasos siguientes deben ser realizados en gabinete de bioseguridad (GBS), usando todos elementos de protección personal (EPP) que se encuentran en la “Guía de Bioseguridad en el diagnóstico de tuberculosis para laboratorios”

Antes de realizar el análisis, **es preciso confirmar la presencia de bacilos alcohol ácido resistente (BAAR) en el tubo MGIT™ positivo realizando un frotis teñido con técnica Ziehl-Neelsen.**

ii. REALIZACIÓN DE TÉCNICA CON TUBOS MGIT™ POSITIVOS.

1. Idealmente, trabajar tubos MGIT™ con frotis positivos para BAAR, dentro de los 5 días desde aviso de positividad en equipo.
2. Vortear el tubo MGIT™ bien tapado durante 30 segundos para asegurar una buena mezcla de la suspensión.

iii. INOCULACIÓN DEL DISPOSITIVO DE PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN (ID).

El dispositivo de identificación rápida puede ser almacenado en un rango de temperaturas que van desde los 2-30°C, aunque se recomienda que se almacene refrigerado con temperaturas entre 2 y 8°C. Deben ser evitadas la luz solar directa, humedad excesiva y las altas temperaturas. Las bolsas de aluminio que contienen los dispositivos no deben abrirse hasta la realización del ensayo. Evitar tocar la celda para muestra del dispositivo con las manos.

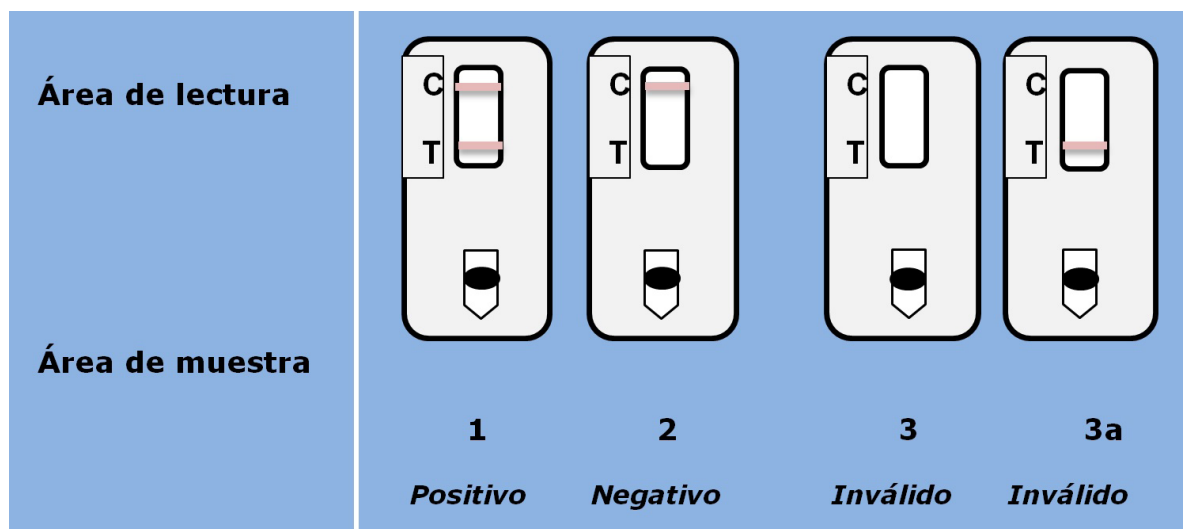
1. Si los dispositivos se encuentran refrigerados, llevarlos a temperatura ambiente dentro del envase de aluminio antes de la muestra.
2. Colocar el dispositivo sobre una superficie plana dentro del GBS. Retirar el dispositivo de identificación rápida de la bolsa de aluminio al momento de realizar la prueba.
3. Identificar cada dispositivo con la numeración de la muestra a ensayar.
4. Colocar 100 µL de la muestra de cultivo MGIT en la celda de muestras del dispositivo de identificación rápida. Cambiar la punta de micropipeta (limpia, con filtro y estéril) para cada muestra.
5. Examine el área de lectura del dispositivo de identificación rápida después de 15 minutos y registre el resultado de la prueba. No interpretar la prueba después de 60 minutos.

iv. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Los siguientes esquemas son específicos para el kit BD TBc ID™. Sin embargo, el test TAUNS Capilia TB™ y SD bioline™ TB Ag MPT64 Rapid se interpreta de la misma manera (Imagen N°1).

Imagen N°1

interpretación de resultados.



1. **Positivo:** En las zonas de lectura de prueba [T] y Control [C] del dispositivo se forman líneas de color rosa / púrpura a rojas.
2. **Negativo:** En las zonas de lectura de prueba Control [C] del dispositivo se forman líneas de color rosa/púrpura a roja, pero no en la zona de lectura de prueba [T].
3. **Inválido:** Si no se observa línea en la zona de lectura de prueba Control [C] del dispositivo, significa que ha ocurrido un error técnico o el producto está dañado. En este caso se considera inválida la prueba, se repite usando un nuevo dispositivo, independiente del resultado de la zona de lectura de prueba [T].

NOTA:

1. Si el test de identificación rápida es negativo, pero la muestra es BAAR positivo y el aislado tiene características morfológicas consistente con CMTBC, reincubar el tubo de MGIT a 37°C (+-1°C) y repetir el test después de 48 hrs. Si el CMTBC es detectado el informe de resultado debe contener la siguiente información:
“Cultivo líquido positivo para Complejo *Mycobacterium tuberculosis*”.
2. Lo adecuado para realizar el test es utilizar cultivos puros sin contaminación, sin embargo se ha observado que una contaminación leve con bacterias no interfiere con la prueba, los cultivos groseramente contaminados pueden causar interferencias; por lo que se sugiere interpretar con precaución.
3. El *Staphylococcus aureus* produce la proteína A, la que puede interferir y/o causar resultados falsos positivos en todos los ensayos de inmunocromatografía lateral.
4. Un resultado negativo no siempre descarta CMTBC, debido a las mutaciones que surgen en el gen MPT/MPB 64 y a la sensibilidad del método. Si la sospecha de CMTBC es alta, y los resultados de identificación persisten con resultados negativos, enviar la cepa al ISP
5. Si el test es inválido:
 - Investigar las causas del resultado no válido y tratar de resolver; por ejemplo, realizar descontaminación de un cultivo con alto grado de contaminación.
 - Repetir la prueba.
 - Si la prueba sigue siendo no válida, envíe a ISP para la realización de pruebas adicionales.
6. Registrar en las observaciones los resultados inválidos o no interpretables; por ejemplo, un cultivo contaminado.

V. CONTROL DE CALIDAD INTERNO DEL TEST DE IDENTIFICACIÓN RÁPIDA.

Cada dispositivo contiene controles de procedimiento interno positivo y negativo. La aparición de una línea de control en la ventana situada en la posición de control “C” proporciona un control positivo interno que valida el funcionamiento correcto del reactivo y garantiza que se ha seguido el procedimiento de análisis adecuado. El área de la membrana situada alrededor de las líneas de análisis y de control, constituye el control interno negativo del dispositivo. Un área de fondo de color blanco a rosado claro indica que el análisis se está realizando correctamente.

Se deben realizar controles positivos y negativos con cada nuevo lote o nueva recepción de kits de identificación. Del mismo modo, estos controles deben ejecutarse semanalmente, o junto con cada batería de cultivos de pacientes, cuando las pruebas se configuran con menos frecuencia.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Becton, Dickinson and Company. BACTEC MGIT 960 System User's Manual. BD Document Number MA-0117. Sparks, Maryland, 2004/06.
2. Becton, Dickinson and Company. BACTEC MGIT 960 AST Instructions. BD Document Number MA-0126. Sparks, Maryland, 2007/01.
3. Mycobacteriology Laboratory Manual. Global laboratory initiative advancing TB diagnostic. First Edition, April 2014.
4. MGIT™ Procedure Manual. For Bactec™ MGIT 960™ TB System (Also applicable for Manual MGIT), FIND, Julio 2016.
5. Manual de Organización y Procedimientos del Programa Nacional de Control y Eliminación de la Tuberculosis. Ministerio de Salud de Chile. Mayo 2016.
6. Implementing the WHO Stop TB Strategy: A Handbook for National Tuberculosis Control Programmes. Geneva: World Health Organization; 2008. 14, Laboratory services. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310753/>
7. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children – 2nd ed. World Health Organization ISBN 978 92 4 154874 8
8. Guidelines for the programmatic management of drug resistant tuberculosis - 2011 update. Geneva, World Health Organization, 2011 (WHO/H™/TB/2011.6).
9. Guía de bioseguridad en el diagnóstico de tuberculosis para laboratorios Instituto de Salud Pública de Chile, 2017
10. Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis. Organización Mundial de la Salud. 2013. (http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html).
11. Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. 5th ed. 1. Antitubercular Agents - pharmacology. 2. Tuberculosis, Multidrug-Resistant - epidemiology. 3. Drug Resistance. 4. Epidemiologic Surveillance - methods. 5. Guideline. I. World Health Organization. ISBN 978 92 4 154913 4 (NLM classification: WF 360).
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes. Approved Standard. Wayne, PA. NCCLS. 2003. Document nº M24-A.