

DOCUMENTO TÉCNICO:

**MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO
BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS**



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**

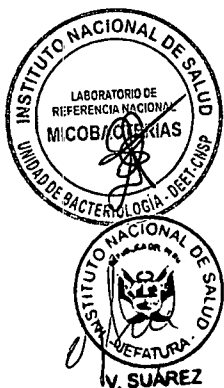
ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	4
II.	FINALIDAD	4
III.	OBJETIVO	4
IV.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	4
V.	BASE LEGAL	4
VI.	CONTENIDO	5
6.1.	DEFINICIONES OPERATIVAS	5
6.2.	SIGLAS	8
6.3.	MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD	10
6.3.1.	<i>Operaciones dentro de la Cabina de Seguridad Biológica</i>	10
6.3.2.	<i>Centrifugación</i>	11
6.3.3.	<i>Kit de limpieza de derrames</i>	12
6.3.4.	<i>Plan de contingencia para accidentes de trabajo</i>	12
6.4.	TIPO DE MUESTRA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN	14
6.4.1.	<i>Tipo de muestra</i>	14
6.4.2.	<i>Transporte de muestra</i>	14
6.4.3.	<i>Conservación de muestra</i>	14
6.5.	ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y DE LA RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS DE RIFAMPICINA E ISONIACIDA	15
6.5.1.	<i>Fundamento</i>	15
6.5.2.	<i>Equipos, materiales y reactivos</i>	15
6.5.3.	<i>Cantidad y tipo de muestra</i>	17
6.5.4.	<i>Procedimiento</i>	18
6.6.	ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y DE LA RESISTENCIA A FLUOROQUINOLONAS E INYECTABLES DE SEGUNDA LÍNEA	26
6.6.1.	<i>Fundamento</i>	26
6.6.2.	<i>Equipos, materiales y reactivos</i>	27
6.6.3.	<i>Cantidad y tipo de muestra</i>	27
6.6.4.	<i>Procedimiento</i>	27
6.7.	ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSIS	31
6.7.1.	<i>Fundamento</i>	31
6.7.2.	<i>Ensayo de sonda en línea para identificación de micobacterias comunes</i>	31
6.7.3.	<i>Ensayo de sonda en línea para la identificación de micobacterias adicionales</i>	33
6.7.4.	<i>Ensayo de sonda en línea para la identificación de micobacterias pertenecientes al complejo Mycobacterium tuberculosis</i>	34
6.7.5.	<i>Equipos, materiales y reactivos</i>	34
6.7.6.	<i>Cantidad y tipo de muestra</i>	34
6.7.7.	<i>Procedimiento</i>	35
6.8.	AMPLIFICACIÓN AUTOMATIZADA DEL ÁCIDO NUCLEICO EN TIEMPO REAL ALTAMENTE SENSIBLE (ULTRA) PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y DE LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA	36
6.8.1.	<i>Fundamento</i>	36
6.8.2.	<i>Equipos, materiales y reactivos</i>	37
6.8.3.	<i>Cantidad de muestra</i>	38



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**

6.8.4.	<i>Procedimiento</i>	38
6.8.5.	<i>Informe de resultados</i>	39
6.8.6.	<i>Interpretación de resultados (Anexo 11)</i>	39
6.9.	CONTROL DE CALIDAD DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TUBERCULOSIS	42
6.9.1.	<i>Ensayo de sonda en línea para la identificación del Complejo Mycobacterium tuberculosis y de la resistencia a rifampicina e isoniacida</i>	42
6.9.2.	<i>Ensayo de sonda en línea para la identificación del Complejo Mycobacterium tuberculosis y de la resistencia a fluoroquinolonas e inyectables de segunda línea</i>	42
6.9.3.	<i>Ensayo de sonda en línea para la identificación del Complejo Mycobacterium tuberculosis y Micobacterias no tuberculosis</i>	42
6.9.4.	<i>Amplificación automatizada del ácido nucleico en tiempo real altamente sensible (Ultra) para la detección simultánea del Complejo Mycobacterium tuberculosis y de la resistencia a rifampicina</i>	42
VII.	RESPONSABILIDADES	43
7.1.	NIVEL NACIONAL	43
7.2.	NIVEL REGIONAL	43
7.3.	NIVEL LOCAL	43
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	43
IX.	ANEXOS	44
	ANEXO 1: DESINFECTANTES.....	45
	ANEXO 2: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN.....	47
	ANEXO 3: PREPARACIÓN DEL TAMPÓN FOSFATO.....	48
	ANEXO 4: PROCESO DE DIGESTIÓN Y DESCONTAMINACIÓN DE LA MUESTRA DE ESPUTO.....	49
	ANEXO 5: PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.....	50
	ANEXO 6: PREPARACIÓN DE MEZCLA MAESTRA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (12 MUESTRAS).....	51
	ANEXO 7: PROCEDIMIENTO DE CARGADO DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO Y AMPLIFICACIÓN.....	52
	ANEXO 8: PROCEDIMIENTO DE HIBRIDACIÓN REVERSA.....	53
	ANEXO 9: ESTRATIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA PARA ISONIACIDA Y MOXIFLOXACINA EN MUTACIONES ASOCIADAS CON "RESISTENCIA DE BAJO NIVEL" O "RESISTENCIA DE ALTO NIVEL", Y CLASIFICACIÓN DE LA RESISTENCIA PARA AMIKACINA.....	56
	ANEXO 10: PROCESO DEL ENSAYO "AMPLIFICACIÓN AUTOMATIZADA DEL ÁCIDO NUCLEICO EN TIEMPO REAL ALTAMENTE SENSIBLE": INACTIVACIÓN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	59
	ANEXO 11: RESULTADOS DE LA PRUEBA MOLECULAR "AMPLIFICACIÓN AUTOMATIZADA DEL ÁCIDO NUCLEICO EN TIEMPO REAL ALTAMENTE SENSIBLE".....	61



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad transmisible, prevenible y curable causada por bacilos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El problema de controlar y eliminar la tuberculosis se agrava aún más por la presencia de cepas resistentes a los medicamentos, lo cual es considerado un importante problema de salud pública que amenaza el progreso logrado en la atención, control y erradicación de la tuberculosis en el Perú y el mundo.

El Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud es el ente técnico nacional encargado de evaluar e implementar los métodos de diagnóstico laboratoriales recomendados por la Organización Mundial de la Salud para la detección de la tuberculosis y sus formas resistentes.

Durante años, el diagnóstico de la tuberculosis y su resistencia asociada estuvo basada únicamente en el uso de las metodologías convencionales comprendidas por cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* en medios sólidos y/o líquidos. Esto genera dificultades en la obtención rápida y oportuna de resultados dado que, al estar sujetas al tiempo de duplicación celular de *Mycobacterium tuberculosis* (18 a 20 horas), se requieren tiempos prolongados para la obtención de resultados. Frente a esto, las pruebas moleculares para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la determinación rápida de sensibilidad a fármacos antituberculosis brindan opciones actuales en la lucha contra la tuberculosis. Debido a que estas pruebas se basan en el análisis de la información genética en lugar de ensayos basados en el crecimiento, se obtiene un tiempo de respuesta potencial de horas en lugar de semanas, lo que a su vez brinda la opción de realizar un rápido tratamiento adecuado y el corte oportuno de la transmisión en la comunidad.

II. FINALIDAD

Estandarizar y proporcionar al personal de laboratorio los procedimientos técnicos de las pruebas moleculares para el diagnóstico bacteriológico y de la sensibilidad de la tuberculosis.

III. OBJETIVO

Proporcionar al personal de laboratorio que realiza el diagnóstico de tuberculosis la información técnica detallada necesaria sobre los procedimientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico y de la sensibilidad de la tuberculosis, mediante el uso de las pruebas moleculares que se utilizan en el Perú.

IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente Manual es de aplicación obligatoria en todos los laboratorios de los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo del Ministerio de Salud, a cargo de las Direcciones de Redes Integradas de Salud, y de los Gobiernos Regionales, a cargo de las Direcciones Regionales de Salud, Gerencias Regionales de Salud o las que hagan sus veces a nivel regional. Asimismo, puede servir de referencia y como documento de interés para las instituciones públicas y privadas que realicen diagnóstico bacteriológico y de la sensibilidad de la tuberculosis.

V. BASE LEGAL

- Ley N° 26842, Ley General de Salud, y sus modificatorias.
- Decreto Legislativo N° 1161, que aprueba la Ley de Organización y Funciones del Ministerio de Salud, y sus modificatorias.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Decreto Supremo N° 001-2003-SA, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud.
- Resolución Ministerial N° 715-2013/MINSA que aprueba la NTS N° 104-MINSA/DGSP-V.01 "Norma Técnica de Salud para la Atención Integral de las Personas Afectadas por tuberculosis", y sus modificatorias.
- Resolución Ministerial N° 895-2018/MINSA que aprueba la NTS N° 143-2018/MINSA/DGIESP "Norma Técnica de Salud para la Prevención y Control de la Coinfección de la Tuberculosis y Virus de la Inmunodeficiencia Humana en el Perú".
- Resolución Ministerial N° 463-2019/MINSA que aprueba NTS N° 153-MINSA/2019/INS: "Norma Técnica de Salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias Infecciosas".

VI. CONTENIDO

6.1. DEFINICIONES OPERATIVAS

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

Cepa: Variante genética o subtipo de un microorganismo usualmente propagada de forma clonal.

Ciclo umbral: Es el número de ciclos donde la fluorescencia del material genético amplificado sobrepasa la fluorescencia basal. El valor del ciclo umbral es inversamente proporcional al cuadrado de la cantidad inicial de ácido desoxirribonucleico.

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

Control de procesamiento de la muestra: Revisión que confirma que la muestra problema se procesó correctamente. El sistema utiliza esporas no infecciosas incluidas en cada cartucho para verificar el procesamiento adecuado de *Mycobacterium tuberculosis*. El control de procesamiento de sonda confirma que se ha producido: i) La lisis de *Mycobacterium tuberculosis*, ii) el adecuado procesamiento de la muestra, y iii) detecta la inhibición de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real causada por factores de la muestra. El control de procesamiento de muestra se considera superado si cumple los criterios de aceptación asignados.

Control de verificación de la sonda: Revisión realizada por el sistema antes de iniciar la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real. El sistema mide la señal de fluorescencia de las sondas para monitorear: i) La rehidratación de las microesferas de reactivos, ii) el llenado del tubo de reacción, iii) la integridad de las sondas y iv) la estabilidad del fluoróforo. Los resultados se comparan automáticamente con los ajustes de fábrica preestablecidos en el programa informático y se considera superada si cumple los criterios de aceptación asignados.

Fluoróforo: Molécula que absorbe energía luminosa de una longitud de onda específica y vuelve a emitir luz a una longitud de onda más larga. Las longitudes de onda absorbidas, la eficiencia de la transferencia de energía y el tiempo previo a la emisión dependen tanto de la estructura del fluoróforo como de su entorno químico, ya que la molécula en su estado excitado interactúa con las moléculas circundantes.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Hibridación reversa: Unión complementaria de las moléculas objetivo (ácidos nucleicos de secuencia no conocida) con las moléculas de la sonda (ácidos nucleicos de secuencia conocida) inmovilizadas en un soporte sólido. La eficiencia de unión depende de la complementariedad de bases y de la temperatura.

Locus: Posición particular en el genoma que determina la ubicación de un gen o un marcador molecular.

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

Mutación génica: Alteración permanente de la secuencia salvaje o natural del ácido desoxirribonucleico.

NETLAB: Sistema de información electrónica que, a través de la web, permite consultar los resultados de las pruebas de laboratorio realizadas por el Instituto Nacional de Salud, la Red de Laboratorios de Referencia Regional y hospitales de la Red de Laboratorios de Salud Pública.

Plataforma Multifuncional Molecular Automatizada: Plataforma que automatiza e integra el procesamiento de las muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de las secuencias objetivo en muestras simples o complejas. La plataforma consta de un equipo automatizado de amplificación en tiempo real, un ordenador personal, un lector de códigos de barras, un cartucho de procesamiento y un programa informático precargado para realizar pruebas en las muestras problema y analizar los resultados.

Pruebas moleculares: Son pruebas de laboratorio utilizadas para determinar la existencia de moléculas objetivo (ej. ácido desoxirribonucleico) en muestras biológicas. Sirven para el diagnóstico de distintas enfermedades y caracterización de alteraciones génicas que conducen a la resistencia frente a determinados fármacos.

Reacción en Cadena de la Polimerasa: Técnica molecular utilizada para la amplificación exponencial de un segmento específico de ácido desoxirribonucleico (secuencia objetivo) mediante múltiples ciclos de síntesis de material genético a partir de oligonucleótidos cebadores.

Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real: También llamada 'Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa', es una reacción donde los procesos de amplificación exponencial y detección de productos fluorescentes se realizan de manera simultánea, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, debido a que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ácido desoxirribonucleico formado se puede determinar en tiempo real la cantidad de material genético sintetizado en cada ciclo.

Región Determinante de Resistencia a la Rifampicina: Región específica del gen *rpoB* de *Mycobacterium tuberculosis* conformada por 81 pares de bases (residuos aminoacídicos 507 – 533, según la nomenclatura de *E. coli*) donde ocurren entre el 95 – 97% de mutaciones asociadas a drogorresistencia de mayor prevalencia a nivel mundial.

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

Resistencia detectada: Término utilizado cuando se hibridan una o más sondas mutantes que identifican mutaciones específicas que confieren resistencia a los fármacos (independientemente de la hibridación de las sondas salvajes).



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Resistencia inferida: Término utilizado cuando no se hibridan una o más sondas salvajes en regiones del gen que se sabe que confieren resistencia al fármaco, y no se desarrolla ninguna de las sondas mutantes en la región correspondiente. En este caso, solo se puede informar la región en la que se encuentra la mutación y no la mutación precisa.

Resistencia no detectada: Resultado emitido cuando se visualiza una hibridación correcta de todas las sondas salvajes y ninguna hibridación de las sondas mutantes. Este resultado se emite debido a las limitaciones propias de los ensayos de sonda en línea y al hecho de que la resistencia no se puede excluir por completo incluso en presencia de todas las sondas salvajes (ya que no todas las mutaciones que confieren resistencia están cubiertas por estas pruebas, y las mutaciones que están cubiertas pueden ocurrir por debajo del límite de detección).

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

Sonda de control de amplificación: La hibridación positiva de esta sonda sucede cuando un fragmento de ácido desoxirribonucleico de tipo control se une a la zona de control de amplificación y al reaccionar con el sustrato revela una banda colorimétrica. La presencia de la banda denota una reacción exitosa de extracción y amplificación del ácido desoxirribonucleico.

Sonda de control de conjugado: La hibridación positiva de esta sonda evidencia la eficacia de unión del conjugado (fosfatasa alcalina conjugada a la estreptavidina) a la biotina, y la adecuada reacción del sustrato revela una banda colorimétrica.

Sonda de control de género: La hibridación positiva de esta sonda evidencia la presencia de una cepa del género *Mycobacterium*, y al reaccionar con el sustrato revela una banda colorimétrica.

Sonda de control interno: La hibridación positiva de esta sonda sucede cuando un fragmento de ácido desoxirribonucleico de tipo control se une a la zona de control interno y al reaccionar con el sustrato revela una banda colorimétrica. La presencia de la banda denota una reacción exitosa de extracción y amplificación del ácido desoxirribonucleico.

Sonda de control universal: La hibridación positiva de esta sonda evidencia la presencia de todas las micobacterias y miembros del grupo de bacterias gram-positivas con alto contenido de Guanina/Citosina, y al reaccionar con el sustrato revela una banda colorimétrica.

Tiras de ácido desoxirribonucleico: Tiras de membrana recubierta con sondas de ácido desoxirribonucleico altamente específicas y complementarias a productos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa obtenidos de la muestra problema. Estos productos, en su estado monocatenario, se unen específicamente a las sondas durante la hibridación reversa; mientras que los productos unidos de forma no específica se eliminan en los pasos posteriores de lavado. Durante la reacción de unión al conjugado, los productos unidos específicamente son marcados con la molécula fosfatasa alcalina, la cual actúa enzimáticamente sobre un sustrato y se visualiza una coloración. Como producto final, se desarrolla un patrón de bandas que evidencia la hibridación positiva de las sondas de ácido desoxirribonucleico respectivas.

Tuberculosis: Enfermedad infecciosa causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* y se contagia de persona a persona a través de gotas microscópicas liberadas en el aire. En el 80 - 85% de casos diagnosticados se observa una afección a los pulmones; sin embargo, puede manifestarse en cualquier órgano ya que el bacilo tiene la capacidad de diseminarse por todo el organismo.

Tuberculosis multidrogorresistente: Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia simultánea a los fármacos de rifampicina e isoniacida.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Tuberculosis pre extensamente drogorresistente: Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que cumplen la definición de Tuberculosis multidrogorresistente, o tuberculosis resistente a rifampicina, y que también son resistentes a cualquier fluoroquinolona.

Tuberculosis pulmonar: Tipo de tuberculosis que compromete el parénquima pulmonar. Los pacientes con tuberculosis pulmonar generalmente tienen tos, una radiografía de tórax anormal y pueden ser infecciosos.

Tuberculosis resistente a rifampicina: Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con resistencia a rifampicina.

Tuberculosis sensible: Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que no presentan resistencia a los medicamentos antituberculosis.

6.2. SIGLAS

a	:	Adenina.
AC	:	Sonda de control de amplificación.
ADN	:	Ácido desoxirribonucleico.
Ala	:	Alanina.
A-LYS	:	Tampón de lisis.
Am	:	Amikacina.
AM-A	:	Mezcla de amplificación A.
AM-B	:	Mezcla de amplificación B.
A-NB	:	Tampón de neutralización.
ARN	:	Ácido ribonucleico.
AS	:	Especies adicionales de micobacterias.
Asn	:	Asparagina.
Asp	:	Ácido aspártico.
ATCC	:	Colección Americana de Cultivos Referenciales.
BK	:	Baciloscopía.
c	:	Citosina.
C+	:	Control positivo.
CC	:	Sonda de control de conjugado.
Cm	:	Capreomicina.
CM	:	Micobacterias comunes.
CMTB	:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
CON-C	:	Conjugado concentrado.
CON-D	:	Tampón de dilución del conjugado concentrado.
CSB	:	Cabina de Seguridad Biológica.
Ct	:	Ciclo umbral.
DEN	:	Solución de desnaturalización.
DIRESA	:	Dirección Regional de Salud.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS**

DIRIS	:	Dirección de Redes Integradas de Salud.
EPP	:	Equipo de Protección Personal.
FLQ	:	Fluoroquinolona.
g	:	Guanina.
GC	:	Sonda de control de género.
GERESA	:	Gerencia Regional de Salud.
Glu	:	Ácido glutámico.
Gly	:	Glicina.
H	:	Isoniacida.
His	:	Histidina.
HYB	:	Tampón de hibridación.
IC	:	Sonda de control interno.
INS	:	Instituto Nacional de Salud.
ISL	:	Inyectable de Segunda Línea.
Km	:	Kanamicina.
Lfx	:	Levofloxacin.
LRNM	:	Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias.
Leu	:	Leucina.
Mfx	:	Moxifloxacin.
MNT	:	Micobacterias No Tuberculosis.
MTB	:	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
MTBC	:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
NTM-DR	:	Drogoresistencia en micobacterias no tuberculosis.
MUT	:	Sonda de ADN tipo mutante.
NALC	:	N-Acetil L-Cisteína.
OMS	:	Organización Mundial de la Salud.
OPS	:	Organización Panamericana de la Salud.
PCC	:	Control de verificación de la sonda.
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PMMA	:	Plataforma Multifuncional Molecular Automatizada.
Pro	:	Prolina.
Q-PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.
R	:	Rifampicina.
RDRR	:	Región Determinante de Resistencia a Rifampicina.
RIN	:	Solución de enjuague.
Ser	:	Serina.
SIB	:	Solicitud de Investigación Bacteriológica.
SPC	:	Control de procesamiento de la muestra.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**

SR	:	Reactivo de procesamiento de muestra.
STR	:	Solución de lavado astringente.
SUB-C	:	Sustrato concentrado.
SUB-D	:	Tampón de dilución del sustrato concentrado.
t	:	Timina
TB	:	Tuberculosis.
TB-MDR	:	Tuberculosis multidrogorresistente.
TB-Pre-XDR	:	Tuberculosis pre extensamente drogorresistente.
TB-RR	:	Tuberculosis resistente a rifampicina.
Thr	:	Treonina.
TUB	:	Sonda de identificación del complejo <i>M. tuberculosis</i> .
Tyr	:	Tirosina.
UC	:	Sonda de control universal.
UFC	:	Unidades Formadoras de Colonias.
Val	:	Valina
Vm	:	Viomicina.
WT	:	Sonda de ADN tipo salvaje.

6.3. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Las medidas de bioseguridad son normas destinadas a reducir el riesgo de transmisión de microorganismos de fuentes reconocidas o no reconocidas de infección en los servicios de salud, vinculadas a accidentes por exposición a muestras biológicas cuando se realizan pruebas de diagnóstico de TB. Las técnicas microbiológicas apropiadas y el uso correcto del equipo de bioseguridad por personal bien entrenado son los pilares fundamentales de la bioseguridad en el laboratorio¹.

El personal involucrado en los diferentes procesos para el diagnóstico bacteriológico debe cumplir las medidas de bioseguridad, así como usar los EPP adecuados, según lo establecido en el documento normativo MAN-INS-001 "Manual de procedimientos - Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos"- Serie de Normas Técnicas N° 18, aprobado por Resolución Jefatural N° 478-2005-J-OPE/INS² o la que haga sus veces y en el "Manual de Seguridad en el Laboratorio - Trabajo seguro en torno a la TB" de la OPS, publicada en el año 2022³.

Toda muestra que ingresa al laboratorio de procesamiento de muestras de TB debe ser considerada como potencialmente infecciosa. Es importante mencionar que el método descrito debe de seguir las medidas de bioseguridad esenciales para los laboratorios de TB, las cuales se encuentran detalladas en el "Manual de Seguridad en el Laboratorio - Trabajo seguro en torno a la TB" de la OPS³.

Las principales consideraciones que se deben tener en cuenta cuando se trabaja en un laboratorio que manipula muestras altamente sospechosas de TB, así como cepas de MTB son:

6.3.1. Operaciones dentro de la Cabina de Seguridad Biológica

- Mantener un plan regular de verificación, evaluación o certificación y documentación del buen funcionamiento de la CSB.
- No utilizar la CSB si no funciona correctamente.
- Evitar la circulación de personas cerca de la CSB mientras se trabaja.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Encender la CSB al menos 5 minutos antes de comenzar la tarea para permitir que se establezcan los flujos de aire dentro de la misma.
- Ubicar dentro de la CSB 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 formularios, ni libros, ni registros.
- Para absorber posibles salpicaduras, es conveniente cubrir el área de trabajo con una toalla de papel que debe ser doblada y descartada dentro de un recipiente o bolsa para autoclave al finalizar el trabajo.
- No bloquear las rejillas por las que circula el aire dentro de la CSB con ningún objeto.
- No utilizar mecheros dentro de la CSB porque alteran el flujo de aire y afectan la duración e integridad de los sistemas de filtración.
- Esperar un minuto luego de introducir las manos para comenzar a operar, de manera que el flujo laminar sea óptimo.
- Operar en la zona media de la CSB.
- No dejar destapados los tubos, frascos o botellas con los que se está operando. Cerrarlos inmediatamente después de haber sacado o transferido material de o hacia dentro de ellos, respectivamente.
- No abrir un envase o tubo conteniendo una muestra biológica sin haber cerrado antes el anterior.
- No dejar destapados los envases o tubos en ningún paso del procesamiento.
- Descartar remanentes de agua destilada, solución descontaminante o tampones utilizados para tratar una serie de muestras.
- No subir ni abrir la ventana de la CSB mientras se está trabajando.
- Al finalizar la tarea, dejar la CSB funcionando durante 10 a 15 minutos para purgar el aire contaminado.
- Descontaminar las superficies interiores de las CSB antes y después de cada uso. Al final del día, la desinfección final de superficies se realiza pasando un paño desinfectante por la superficie de trabajo, los laterales, la parte trasera y el interior del cristal. Realizar una segunda limpieza con agua estéril (o alcohol al 70%) cuando se emplee un desinfectante corrosivo como el cloro.
- Finalmente, encender la lámpara con radiación ultravioleta por 15 minutos.
- Para el caso de sospecha de contaminación con material genético, utilizar cloro al 1%, luego enjuague con agua destilada estéril o etanol al 70%.
- Para el traslado de la CSB se recomienda primero descontaminarla. Esta actividad debe ser realizada por un equipo técnico entrenado. Se recomienda programar este trabajo para un fin de semana.



6.3.2. Centrifugación

- Utilizar una centrifuga refrigerada segura y tubos de polipropileno descartables.
- Asegurar rigurosamente el equilibrio de los tubos colocados en forma opuesta dentro del rotor de la centrifuga.
- Respetar los límites de carga y velocidad de la centrifuga establecidas por la empresa fabricante.
- Nunca abrir la centrifuga mientras está en funcionamiento.
- Abrir los contenedores de tubos de la centrifuga únicamente dentro de la CSB.

Nota: En caso se sospeche o se compruebe alguna rotura dentro de los contenedores de tubos de la centrifuga, se debe esterilizar en autoclave dichos contenedores sin recurrir a abrirlos.

- Dejar reposar los tubos al menos 5 minutos después de centrifugarlos o agitarlos (manualmente o con agitador de tubos tipo vórtex) antes de proceder a destaparlos.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

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

6.3.3. Kit de limpieza de derrames

Los accidentes de trabajo relacionados a derrames infecciosos necesitan atención y acción inmediata, por lo tanto, es necesario tener a la mano los artículos necesarios e indispensables para hacerles frente.

En un laboratorio que manipula cepas de MTB es conveniente tener 2 kits de limpieza de derrames (Una en el exterior del área de alto riesgo biológico y otra dentro del mismo).

Los artículos indispensables que debe contener el kit de limpieza de derrames son:

- Al menos una copia del documento que describe el procedimiento operativo para la atención de derrames.
- Cartel con el símbolo de peligro biológico y la palabra **NO INGRESAR** en letras grandes.
- Solución desinfectante que inactive micobacterias (Anexo 1).
- Mascarillas auto filtrantes N95/FFP2 almacenadas en una bolsa con cierre.
- Bolsas con guantes de tamaño pequeño (S), mediano (M) y grande (L) (10 por bolsa).
- Protector de calzado y gorras.
- Mandiles descartables e impermeables de tamaño pequeño, mediano y grande (por lo menos 2 de cada tamaño).
- Papel absorbente.
- Etanol al 70%.
- Gafas protectoras (por lo menos 2 pares).
- Escobilla.
- Recogedor.
- Pinzas descartables.
- Recipiente descartable para objetos punzantes.
- Bolsas rojas de bioseguridad para descarte de peligros biológicos.



6.3.4. Plan de contingencia para accidentes de trabajo

A. Derrame dentro de la Cabina de Seguridad Biológica

- 1) No apagar la CSB ni interferir con el flujo de aire principal.
- 2) Esperar 15 minutos para que los aerosoles en la CSB desaparezcan antes de empezar el procedimiento de limpieza.
- 3) Empapar el papel absorbente en desinfectante, luego cubrir el derrame. Si las paredes de la CSB están contaminadas, limpiarlas con papel con desinfectante.
- 4) Usar pinzas para recoger los objetos punzantes y colocarlos en el recipiente para objetos punzantes.
- 5) Colocar los elementos desechables no utilizados dentro de la CSB en una bolsa para sustancias biológicas peligrosas. No reutilizar.
- 6) Limpiar los equipos y otros elementos reutilizables con desinfectante (ej. vórtex, micropipetas, contenedores de tubos de centrifuga, tapas, etc.) y retirarlos de la CSB.
- 7) Limpiar las paredes, el piso y el interior de la ventana de la CSB con desinfectante y dejar actuar por lo menos 30 minutos.
- 8) Colocar todos los materiales de limpieza en una bolsa para descarte de sustancias biológicas peligrosas.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- 9) Quitarse los guantes dentro de la CSB y colocarlos dentro de una bolsa para descarte de sustancias biológicas peligrosas.
- 10) Colocar la bolsa para descarte de sustancias biológicas peligrosas dentro de otra bolsa más y esterilizar en la autoclave.
- 11) Registrar el incidente haciendo constar la fecha, nombres de personas involucradas y el número que identifica las muestras y/o cultivos (material biológico) que se estuvo manipulando.

B. Derrame fuera de la Cabina de Seguridad Biológica

- 1) Evacuar inmediatamente a todas las personas que estén en el área afectada.
- 2) Quitarse todo el EPP (excepto la mascarilla autofiltrante) y dejarlo en el piso del laboratorio.
- 3) Una vez fuera, quitarse y desechar la mascarilla autofiltrante.
- 4) Lavarse las manos.
- 5) Notificar el suceso a la persona responsable de bioseguridad del laboratorio e impedir que alguien vuelva a entrar al área afectada.
- 6) Abrir el kit para derrames y colocar el cartel de **NO INGRESAR** en la puerta de entrada del laboratorio.
- 7) Esperar una hora antes de volver a entrar al laboratorio para permitir que el sistema de ventilación elimine los aerosoles.

Durante el tiempo de espera:

- El/la responsable de bioseguridad establece quienes deben participar en la limpieza y asigna funciones.
- Analizar la naturaleza y localización del derrame.
- Examinar el procedimiento operativo normalizado para la limpieza.
- Revisar el contenido del kit para derrames.
- Preparar el papel absorbente y la solución desinfectante.

Se requieren 3 personas para conformar el equipo de limpieza: Una para vigilar la puerta y observar el proceso de limpieza desde el exterior y 2 personas para entrar y limpiar. De estas últimas, una persona es la limpiadora principal y la segunda persona proporciona los artículos requeridos para la limpieza según lo indique la persona que es la limpiadora principal.

Después de cumplida una hora, y antes de entrar al laboratorio, los 2 miembros del equipo de limpieza que ingresan se colocan los EPP que vienen en el kit para derrames.

- 8) Entrar al laboratorio y evaluar la situación.
 - Confirmar la localización y el tamaño del derrame.
 - Brindar un informe verbal a la persona que está en la puerta del laboratorio y confirmar que los planes de limpieza son adecuados.
 - Recolectar todos los EPP que se dejaron atrás durante la evacuación y colocarlos en una bolsa para peligros biológicos.
- 9) Cubrir la zona del derrame con papel absorbente empapado en desinfectante.
- 10) Con cuidado, verter más desinfectante sobre la zona del derrame, comenzando por los bordes externos del derrame y avanzando hacia el centro (dirección concéntrica).
- 11) Esperar por lo menos 30 minutos para que el desinfectante actúe.
- 12) Con unas pinzas, recoger cualquier fragmento de vidrio roto, otros elementos punzantes y objetos pequeños y colocarlos en un recipiente para objetos punzantes.
- 13) Recoger con cuidado los papeles absorbentes y colocarlos en una bolsa para el descarte de sustancias biológicas peligrosas.
- 14) Limpiar el líquido restante desde los bordes hacia el centro. Colocar el papel absorbente usado dentro de una bolsa para descarte de sustancias biológicas peligrosas.
- 15) Repita los pasos contenidos en los numerales 12) al 17) precedentes.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- 16) Limpiar la zona con alcohol al 70%.
- 17) Recoger todas las bolsas para peligros biológicos y recipientes para objetos punzantes y colocarlos en una segunda bolsa para descarte de peligros biológicos y luego esterilizar en autoclave.
- 18) Retirar todos los EPP y colocarlos en una bolsa para descarte de peligros biológicos para su esterilización en la autoclave y posterior eliminación.
- 19) Lavarse las manos y salir del laboratorio.
- 20) Registrar el incidente haciendo constar la fecha, nombres de personas involucradas y el número que identifica las muestras y/o cultivos (material biológico) que se estuvo manipulando.

6.4. TIPO DE MUESTRA, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

6.4.1. Tipo de muestra

Muestras biológicas directas y/o cultivos de MTB obtenidos a partir de medios sólidos o líquidos⁴. Las muestras a ser utilizadas están especificadas por metodología según corresponda.

Condiciones específicas:

- Las muestras deben llegar al laboratorio acompañadas de su respectiva SIB y sin tener ningún tipo de preservante (ej. formol), caso contrario solicitar una nueva muestra.
- No aceptar muestras inadecuadas (muestras con restos de sangre, restos de alimentos, contaminadas o con un volumen insuficiente). En caso esto suceda, se debe informar al servicio para el envío de una nueva muestra de acuerdo al tipo de análisis.

6.4.2. Transporte de muestra

Se deben tener en cuenta los siguientes aspectos⁵:

- Proteger la muestra del calor excesivo y la luz solar.
- Verificar el cierre hermético de la tapa de los envases para evitar los derrames de la muestra.
- Las muestras deben llegar al laboratorio preferentemente dentro de las 72 horas en cadena de frío y ser conservadas entre 2 a 8°C.
- Los cultivos se envían a temperatura ambiente y con sistema de triple embalaje.
- Verificar que las muestras estén bien rotuladas y coincidan con las SIB.
- Si existe un pequeño derrame del contenido, proceder a limpiar el envase con hipoclorito de sodio al 1% o desinfectante de uso del laboratorio. El tiempo de acción del desinfectante varía según la hoja de seguridad química de cada producto. Por ejemplo, el hipoclorito de sodio actúa durante al menos 20 minutos, mientras que los derivados fenólicos de 30 a 45 minutos.
- Evaluar la cantidad y la calidad de las muestras.

6.4.3. Conservación de muestra

- La muestra de esputo debe procesarse de inmediato después de la obtención. Si no es posible procesar el mismo día, se debe conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

Nota: En los casos donde la muestra de esputo no se pudo procesar de inmediato y se requiere realizar el cultivo, esta debe ser almacenada en refrigeración y ser procesada preferentemente dentro de los 3 días desde la toma de muestra para evitar la contaminación.



V. SUÁREZ

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- En caso de muestras extrapulmonares, se debe conservar en refrigeración de 2 a 8°C y procesar dentro de las 24 horas de obtenida la muestra.
- En cuanto a cultivos positivos, una vez realizada la lectura, deben ser enviados inmediatamente al LRNM del INS, o al laboratorio correspondiente que a su vez cuente con una prueba de diagnóstico molecular implementada, para la realización de la prueba de sensibilidad u otra prueba según se requiera.

6.5. ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y DE LA RESISTENCIA A LOS FÁRMACOS DE RIFAMPICINA E ISONIACIDA

6.5.1. Fundamento

Se trata de un ensayo cualitativo *in vitro* basado en la tecnología de tiras de ADN y utilizado para la identificación del CMTB y la detección de resistencia a R e H. El uso de este ensayo permite la identificación de la TB sensible, así como de la TB-RR o TB-MDR. Este ensayo utiliza muestras de esputo con resultados de BK positiva, cultivos en medio sólido (Löwenstein-Jensen, Ogawa) y cultivos en medio líquido⁹. La identificación de la resistencia a R se da por la detección de las mutaciones más frecuentes en la RDRR del gen *rpoB* (que codifica la 'subunidad β de la ARN polimerasa') y está determinada en la tira de ADN por la región que contiene: Una sonda de 'control de locus *rpoB*', 8 sondas WT (que permiten analizar la región génica comprendida entre los codones 505 y 533) y 4 sondas MUT específicas para las mutaciones de mayor prevalencia a nivel mundial Asp516Val (*rpoB* MUT1), His526Tyr (*rpoB* MUT2A), His526Asp (*rpoB* MUT2B) y Ser531Leu (*rpoB* MUT3). La determinación de la resistencia de alto nivel a H es realizada a través de la identificación de mutaciones en el gen *katG* (que codifica para la enzima 'catalasa peroxidasa'), y está determinada en la tira de ADN por la región que contiene: Una sonda de 'control de locus *katG*', una sonda WT (que analiza el codón 315) y 2 sondas MUT específicas para las mutaciones Ser315Thr1 (*katG* MUT1) y Ser315Thr2 (*katG* MUT2). La detección de resistencia de bajo nivel a H se realiza mediante el análisis del gen *inhA* (que codifica la 'NADH enoil ACP reductasa') y está determinada en la tira de ADN por la región que contiene: Una sonda de 'control de locus *inhA*', 2 sondas WT (que cubren la región promotora -16 a -8 del gen) y 4 sondas MUT específicas para las mutaciones no codificantes: c-15t (*inhA* MUT1), a-16g (*inhA* MUT2), t-8c (*inhA* MUT3A) y t-8a (*inhA* MUT3B) (Figura 1). La determinación de la resistencia por este ensayo se clasifica en resistencia detectada y resistencia inferida^{6,7}.



DR. L.F. DONAIRES

6.5.2. Equipos, materiales y reactivos

A. Equipos

- Agitador tipo vórtex.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Baño maría.
- Cabina de PCR.
- Centrifuga refrigerada con contenedor de aerosoles.
- Congeladora (-20°C).
- Cronómetro digital.
- CSB clase II tipo A2.
- Microcentrifuga refrigerada digital con contenedor de aerosoles.
- Micropipeta de rango variable, 0.5 – 10µl.
- Micropipeta de rango variable, 10 – 100µl.
- Micropipeta de rango variable, 20 – 200µl.
- Micropipeta de rango variable, 100 – 1000µl.



V. SUÁREZ

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Minicentrífuga (para microtubos y tubos de PCR).
- Potenciómetro.
- Refrigeradora (2–8°C).
- Termobloque con o sin agitación.
- Termociclador.
- Equipo semiautomatizado de hibridación.

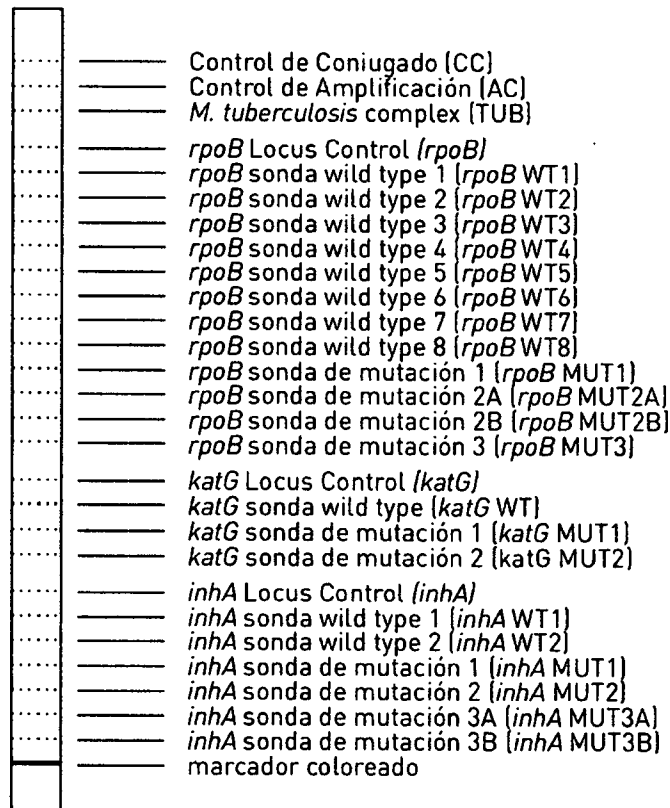


Figura 1. Representación de la distribución de sondas WT y MUT de las 3 regiones génicas analizadas en la tira de ADN del ensayo.

Fuente: Imagen adaptada de un ensayo de sonda en línea.

B. Materiales

- Bandeja de hibridación.
- Caja de acero inoxidable.
- EPP (mascarilla autofiltrante N95/FFP2, guantes de látex o nitrilo, mandil descartable o mameluco, cubre calzado, gorros descartables, gafas protectoras).
- Espátulas de acero inoxidable.
- Flotadores para tubos de 1.5ml.
- Gasa o paño para limpieza de superficies.
- Gradillas para tubos de 0.2ml.
- Gradillas para tubos de 1.5ml.
- Hojas de registro.
- Lapicero gel de tinta líquida.
- Papel absorbente plastificado.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Pinzas.
- Pipetas de transferencia descartables de 3ml.
- Pipetas serológicas de 1 y 10ml.
- Plantilla de interpretación de resultados.
- Plumón marcador.
- Tips de 0.5 -10µl, estéril con filtro.
- Tips de 20µl, estéril con filtro.
- Tips de 200µl, estéril con filtro.
- Tips de 1000µl, estéril con filtro.
- Tubos de centrifuga de 50ml, estéril de polipropileno (base cónica).
- Tubos de microcentrifuga de 1.5ml.
- Tubos de microcentrifuga tapa rosca fondo cónico de 1.5ml.
- Tubos estériles de PCR (0.2ml).

C. Reactivos

Específicos del ensayo:

- AM-A.
- AM-B.
- A-LYS.
- A-NB.
- CON-C.
- CON-D.
- DEN.
- HYB.
- RIN.
- STR.
- SUB-C.
- SUB-D.
- Tiras de ADN.

Generales del laboratorio:

- Agua grado molecular.
- Etanol al 70%.
- Citrato trisódico dihidratado [$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$].
- Fosfato disódico anhidro [HNa_2PO_4].
- Fosfato monopotásico [KH_2PO_4].
- Hidróxido de sodio [NaOH].
- Hipoclorito de sodio al 1% (preparado dentro de las 24 horas).
- NALC.
- Solución de digestión-descontaminación (Anexo 2).
- Tampón fosfato pH 6.8 (Anexo 3).



6.5.3. Cantidad y tipo de muestra

Las muestras de esputo deben tener un volumen mínimo de 3ml. Los cultivos sólidos deben contener preferentemente un mínimo de 5 UFC, y los cultivos líquidos deben tener resultado positivo confirmado para MTB y estar libres de contaminantes.

A. Condiciones previas del método

- Verificar que los datos de la muestra de esputo y cultivo coincidan con los datos de la SIB.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

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

B. Condiciones previas de los reactivos específicos del ensayo

- Retirar de refrigeración las soluciones y las tiras de ADN.
- Precalentar las soluciones HYB y STR a 45°C antes de usar y agitar suavemente hasta que los reactivos estén libres de precipitados.
- Mantener a temperatura ambiente las soluciones CON-D, SUB-D y RIN, con excepción del CON-C y el SUB-C.
- Usar un tubo de centrifuga de 50 ml para diluir las soluciones CON-C y SUB-C en proporción de 1:100 con sus respectivas soluciones de dilución (CON-C diluir usando CON-D y SUB-C diluir usando SUB-D). Mezclar bien y mantener a temperatura ambiente. De este modo, se van a obtener soluciones diluidas del conjugado y sustrato, respectivamente.

Nota: Diluir los concentrados CON-C y SUB-C antes de cada uso y trabajar con cantidades exactas para el proceso de cada día.

C. Interferencias y reacciones cruzadas

- Muestras de esputo con sangre entera al 0.6%, hemoglobina al 0.1%, pus al 2%, lidocaína al 30%, mupirocina a 2.4 mg/ml, aceite de árbol del té al 0.5% y guaifenesina a 5 mg/ml.
- Muestras de esputo hidrolizadas y con restos de alimentos.

D. Fuentes potenciales de variabilidad

- Funcionamiento inadecuado del equipo de hibridación.
- Funcionamiento inadecuado del termociclador.
- Preparación inadecuada de las soluciones diluidas de conjugado y sustrato.
- Tiempo inadecuado de acción de los reactivos específicos del ensayo con la tira de ADN.
- Temperatura de incubación incorrecta.
- Inadecuada mezcla o precalentamiento de las soluciones HYB y/o STR.
- Contaminación durante la extracción de ADN o durante la preparación de los reactivos para la PCR.

Nota: Si los reactivos de PCR están contaminados con ADN micobacteriano, entonces el control negativo debe mostrar bandas de hibridación.

- Contaminación de pocillos adyacentes en la bandeja de hibridación debido a salpicaduras durante la adición y/o homogenización del HYB o de los productos de PCR.



6.5.4. Procedimiento

A. Digestión y descontaminación de la muestra

La digestión y descontaminación de la muestra de esputo se realiza por el método de NALC-NaOH, de acuerdo con el siguiente procedimiento (Anexo 4):

- Colocarse el EPP correspondiente.
- Con una pipeta de transferencia, tomar un volumen de 3ml de muestra de esputo (hasta un máximo de 5ml) y dispensarlo en un tubo de centrifuga de 50ml.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Con una pipeta serológica, adicionar la solución de digestión-descontaminación con el mismo volumen al de la muestra de esputo añadida. Ajustar las tapas y mezclar cada tubo en un vórtex por 5 segundos.
Nota: Es necesario asegurarse que la muestra este completamente licuada. En caso la muestra mantenga su consistencia mucoide o viscosa, agregar más solución de digestión-descontaminación (hasta un máximo de 2ml más) o una pequeña cantidad de NALC en polvo directamente al tubo y mezclar por inversión.
- Dejar que la solución de digestión-descontaminación actúe por 15 minutos a 37°C en baño maría o estufa (o a temperatura ambiente dentro de la CSB).
- Transcurrido el tiempo, agregar tampón fosfato pH 6.8 hasta completar los 50ml y mezclar por inversión.
- Concentrar la muestra mediante centrifugación (15 minutos a 3000g, temperatura de 10°C) y decantar el sobrenadante.
- Resuspender el sedimento agregando 1.5ml de tampón fosfato y agitar en un vórtex por 5 segundos para, finalmente, obtener la muestra descontaminada.
- Realizar la siembra de la muestra descontaminada en 2 tubos de medio de cultivo Löwenstein-Jensen previamente rotulados, a razón de 0.2ml por tubo.
- Conservar el resto de muestra descontaminada en refrigeración (2-8°C) para su posterior uso en el proceso de extracción de ADN.

Al finalizar, todos los materiales potencialmente infecciosos deben ser esterilizados mediante la autoclave para su posterior eliminación.

B. Extracción de ácido desoxirribonucleico

a) Extracción de ácido desoxirribonucleico a partir de muestras de esputos descontaminadas y/o cultivos líquidos.

Para la extracción de ADN se utilizan los reactivos de extracción específicos para el ensayo y se realiza de la siguiente manera (Anexo 5):

- Tomar 500µl de la muestra descontaminada de esputo y transvasar en un tubo de microcentrifuga tapa rosca de 2ml (en caso de cultivo liquido transvasar 1000µl).
- Concentrar las bacterias por centrifugación durante 15 minutos utilizando una microcentrifuga con contenedor de aerosoles a 10000g.
- Eliminar el sobrenadante y adicionar 100µl de A-LYS. Tapar y agitar en un vórtex por 5 segundos.
- Centrifugar por 5 segundos.
- Inactivar las bacterias a 95°C por 5 minutos en un baño maría o termobloque.
- Centrifugar por 5 segundos.
- Agregar 100µl de A-NB. Tapar y agitar en un vórtex por 5 segundos.
- Centrifugar durante 5 minutos a 13000g.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrifuga de 1.5ml.
- Utilizar el ADN directamente o conservar a -20°C hasta su uso.



b) Extracción de ácido desoxirribonucleico a partir de cultivo sólido

La extracción de ADN a partir de cultivo sólido se realiza de la siguiente manera (Anexo 5):

- Coger con la ayuda de una espátula de siembra una pequeña masa bacteriana de colonias y adicionar a un tubo que contiene 100µl de A-LYS.

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Agitar en vórtex y centrifugar por 5 segundos.
- Inactivar las bacterias a 95°C por 5 minutos en un baño maría o termobloque.
- Centrifugar por 5 segundos.
- Agregar 100µl de A-NB. Tapar y agitar en un vórtex por 5 segundos.
- Centrifugar durante 5 min a 13000g.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrifuga de 1.5ml.
- Utilizar el ADN directamente o conservar a -20°C hasta su uso.

Nota: En ambos procesos, al inicio de cada extracción se debe incluir una muestra de control negativo para la detección de una posible contaminación durante la extracción de ADN. Para esto, dispensar 100µl de A-LYS en un tubo de microcentrifuga vacío y seguir con el procesamiento previamente descrito.

C. Amplificación

a) Preparación de la mezcla maestra en el área de pre Reacción en Cadena de la Polimerasa

Preparar la mezcla maestra dentro de una cabina de PCR y en un ambiente separado y libre de ADN. Se utilizan las soluciones AM-A y AM-B del ensayo y se realiza el siguiente procedimiento (Anexo 6):

- Retirar los tubos con solución AM-A (conteniendo *Taq* polimerasa, nucleótidos y tampón) y AM-B (conteniendo cebadores biotinilados más aditivos) de la congeladora y dejar descongelar a temperatura ambiente.
- Centrifugar brevemente los tubos descongelados y mezclar cuidadosamente mediante pipeteo arriba-abajo.
- Realizar la siguiente mezcla por cada muestra:

MEZCLA MAESTRA	
Reactivo	Volumen
AM-A	10µl
AM-B	35µl
Total	45µl



DR. L.F. DONAIRES



V. SUÁREZ

- Determinar el número de muestras de ADN a amplificar. Colocar las cantidades proporcionales de soluciones AM-A y AM-B en un tubo de 1.5 o 2.0ml y mezclar con cuidado, pero a fondo, mediante pipeteo arriba-abajo (No utilizar vórtex). Luego, dispensar en volúmenes de 45µl en tubos de PCR.

Nota: La mezcla maestra debe ser preparada el mismo día y ser usada rápidamente. El cargado de ADN y puesta en marcha del termociclador deben ser realizados dentro de una hora de haber sido preparada la mezcla maestra.

- Para el control negativo del proceso de preparación de mezcla maestra, se debe añadir 5µl de agua grado molecular en uno de los tubos de PCR (dispensado previamente con los 45µl de la mezcla maestra).

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

b) Cargado de ácido desoxirribonucleico

Este procedimiento se realiza dentro de una cabina de PCR. Se debe asegurar que la misma se encuentre libre de productos de PCR y realizar lo siguiente (Anexo 7):

- Para cada muestra se añade 5µl del ADN problema en un tubo conteniendo 45µl de la mezcla maestra, obteniendo un volumen final de 50µl.
- Siempre incluir controles de proceso: Control negativo y control positivo.
 - Tubo control negativo: Añadir 5µl de agua grado molecular en uno de los tubos que contiene la mezcla maestra (Control negativo adicional al control negativo del proceso de preparación de mezcla maestra).
 - Tubo control positivo: Añadir ADN de controles positivos (cepas ATCC) con perfiles conocidos de resistencia a R y H.

c) Perfil de amplificación

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

Temperatura (Tiempo)	Muestras de esputo	Muestras de cultivo
95°C (15 minutos)	1 ciclo	1 ciclo
95°C (30 segundos)	} 20 ciclos	} 10 ciclos
65°C (2 minutos)		
95°C (25 segundos)	} 30 ciclos	} 20 ciclos
50°C (40 segundos)		
70°C (40 segundos)		
70°C (8 minutos)	1 ciclo	1 ciclo



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

D. Hibridación

Este proceso se lleva a cabo en el laboratorio utilizando el equipo de hibridación y se realiza el siguiente procedimiento (Anexo 8):

- Dispensar 20µl de la solución DEN en la esquina inferior de cada uno de los pocillos de la bandeja de hibridación.
- Añadir 20µl de cada producto de PCR y homogenizar mediante pipeteo. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Retirar las tiras de ADN de su contenedor usando una pinza y enumerarlas usando un lapicero de tinta líquida.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Nota: En caso de realizar el procedimiento en un equipo automatizado, los pasos que se mencionan de aquí en adelante se realizan de manera automatizada (seguir las instrucciones del equipo).

- Añadir cuidadosamente en la esquina superior de cada pocillo 1ml de la solución HYB precalentado a 45°C. Agitar suavemente la bandeja hasta que la solución tenga un color homogéneo, evitar derramar la solución en los pocillos cercanos.
- Colocar una tira en cada pocillo de la bandeja. Las tiras tienen que quedar completamente cubiertas por la solución HYB y el lado conteniendo las sondas impresas debe estar hacia arriba (identificable por el marcador coloreado próximo al extremo inferior).

Nota: En caso de que la tira se voltee, volver a su posición con la ayuda de un tip estéril.

- Incubar la bandeja de hibridación durante 30 minutos a 45°C.
- Aspirar el tampón de hibridación en su totalidad empleando una pipeta de transferencia o con la micropipeta usando un tip de 1000µl.
- Añadir 1ml de solución STR a cada tira e incubar durante 15 minutos a 45°C.
- A partir de este paso, trabajar a temperatura ambiente.
- Eliminar completamente la solución STR.
- Lavar una vez cada tira con 1ml de solución RIN sobre la plataforma de agitación del equipo de hibridación durante 1 minuto y eliminarlo después de la incubación.
- Añadir 1ml de la solución de conjugado diluido a cada tira e incubar durante 30 minutos sobre la plataforma de agitación del equipo de hibridación.
- Eliminar la solución y realizar 2 lavados con 1ml de solución RIN durante 1 minuto cada lavado sobre la plataforma de agitación del equipo de hibridación. Desechar la solución por cada lavado.
- Realizar un lavado a cada tira durante 1 minuto con 1ml de agua destilada sobre la plataforma de agitación del equipo de hibridación. Desechar el agua después del lavado.
- Añadir 1ml de la solución de sustrato diluido a cada tira e incubar en el equipo de hibridación por 5 minutos sin agitación y protegiéndolo de la luz hasta que las bandas sean claramente visibles. En caso que las bandas se puedan observar antes del tiempo óptimo, detener la reacción; caso contrario, dejar actuar al sustrato por no más de 10 minutos.
- Lavar las tiras 2 veces con 1ml de agua destilada y desechar totalmente el líquido.
- Retirar las tiras usando pinzas y colocarlas en papel toalla para su secado respectivo y/o dejar las tiras en la bandeja para su secado en el propio equipo de hibridación a una temperatura de 45°C.



E. Interpretación de resultados

Consideraciones para la interpretación de los resultados (Figura 2):

- Pegar en la hoja de registro las tiras reveladas, teniendo en cuenta la alineación de las bandas CC y AC con las líneas respectivas del registro.
- Para una lectura precisa utilizar una plantilla de interpretación de resultados y nivelar adecuadamente cada uno de los genes analizados mediante el alineamiento de las respectivas bandas de control de locus.
- Determinar el estado de resistencia de la tira revelada y anotar los resultados en las respectivas columnas de la hoja de registro.
- Para la interpretación de las tiras reveladas, es necesario tener en cuenta lo siguiente:

- a) **Resultado 'Complejo *Mycobacterium tuberculosis* detectado'**: Resultado emitido cuando se evidencia una hibridación correcta de las



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

sondas CC, AC y TUB. La sonda TUB hibrida con productos de PCR generados por todos los miembros conocidos del CMTB y es interpretada de la siguiente manera:

- Las presencias de la banda TUB y de las bandas WT y/o MUT de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* determina que la muestra contiene una cepa perteneciente al CMTB.
- La presencia de la banda TUB y ausencia de las bandas WT y/o MUT, de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* determina que hay una gran probabilidad de presencia de una cepa perteneciente al CMTB; sin embargo, es necesario repetir la prueba.
- La ausencia de la banda TUB y presencia de las bandas WT y/o MUT, de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* determina que hay una gran probabilidad de presencia de una cepa perteneciente al CMTB; sin embargo, es necesario repetir la prueba.
- Las ausencias de la banda TUB y de las bandas WT y/o MUT de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* determina que la muestra no contiene una cepa perteneciente al CMTB.

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

i) Resistencia no detectada a rifampicina

Se determina cuando:

- Todas las bandas WT del gen *rpoB* son visibles y no se detecta la presencia de alguna banda MUT (Figura 2 – resultados 1 y 3).
Nota: Solamente se consideran como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que la banda AC.

ii) Resistencia no detectada a isoniacida

Se determina cuando:

- Todas las bandas WT de los genes *katG* e *inhA* son visibles y no se detecta la presencia de alguna banda MUT (Figura 2 – resultado 1).

c) Resultado 'Resistencia detectada/inferida': Resultado emitido cuando se evidencia una hibridación correcta de las sondas CC, AC y TUB, además de los siguientes casos:

i) Resistencia detectada/inferida a rifampicina

Se determina cuando:

- Alguna banda WT del gen *rpoB* no es visible y se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia detectada) (Figura 2 – resultados 2 y 4).
- Alguna banda WT del gen *rpoB* no es visible y no se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia inferida) (Figura 2 – resultado 5).

ii) Resistencia detectada/inferida a isoniacida

Se determina cuando:

- Alguna banda WT de los genes *katG* y/o *inhA* no es visible y se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia detectada) (Figura 2 – resultados 2, 3 y 4).
- Alguna banda WT de los genes *katG* y/o *inhA* no es visible y no se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia inferida) (Figura 2 – resultado 5).



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Las mutaciones que confieren resistencia a la H se estratifican en mutaciones asociadas con resistencia de bajo nivel y con resistencia de alto nivel⁷ (Anexo 9). Los resultados deben notificarse según la siguiente jerarquía (donde el signo ">" significa "prima sobre"):

- Mutación detectada, asociada con resistencia de alto nivel > Mutación inferida, asociada con resistencia de alto nivel > Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel > Mutación inferida, asociada con al menos resistencia de bajo nivel > Resistencia no detectada.

Nota:

- Sólo deben ser consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor a la banda AC.
- En raras ocasiones se pueden desarrollar tanto la banda WT como su respectiva banda MUT. Esto representa un resultado válido y puede ocurrir porque la muestra analizada contiene una cepa heterorresistente o contiene más de una cepa del CMTB (ej. debido a una infección mixta del paciente). En este caso, la cepa analizada se determina con resistencia detectada al respectivo antibiótico.
- Si las mutaciones asociadas con resistencia de bajo nivel son inferidas debido a la ausencia de hibridación de las sondas WT del gen *inhA* (y no hay ninguna mutación detectada en la región del gen *katG*), se recomienda repetir la prueba para confirmar el resultado.

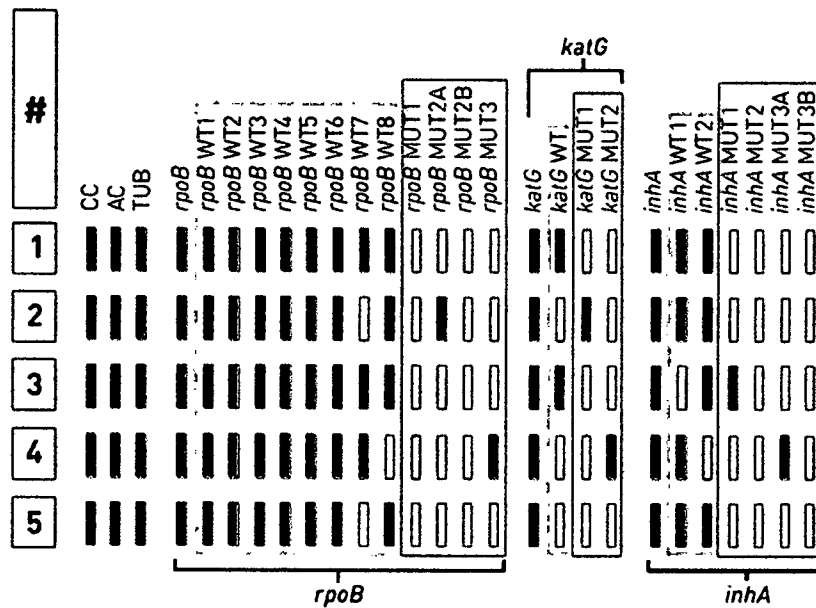


Figura 2. Interpretación de 5 resultados obtenidos por el ensayo.

- Resultado N° 1: Resultado resistencia no detectada para R e H.
- Resultado N° 2: Resultado resistencia detectada a R (ausencia de la banda WT7 y presencia de la banda MUT2A del gen *rpoB*) e H (ausencia de la banda WT y presencia de la banda MUT1 del gen *katG*).
- Resultado N° 3: Resultado resistencia no detectada a R y resistencia detectada a H (ausencia de la banda WT1 y presencia de la banda MUT1 del gen *inhA*).



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Resultado N° 4: Resultado resistencia detectada a R (ausencia de la banda WT8 y presencia de la banda MUT3 del gen *rpoB*) e H (ausencia de la banda WT y presencia de la banda MUT2 del gen *katG*, así como ausencia de la banda WT2 y presencia de la banda MUT3A del gen *inhA*).
- Resultado N° 5: Resultado resistencia inferida a R (ausencia de la banda WT7 y ausencia de todas las bandas MUT del gen *rpoB*) e H (ausencia de la banda WT y ausencia de todas las bandas MUT del gen *katG*).

Fuente: Imagen adaptada de un ensayo de sonda en línea.

Anomalías:

- Si todas las señales son débiles (intensidad menor a la banda AC) o no hay señales (incluyendo la banda CC), se debe a:
 - Temperatura ambiente demasiado baja o reactivos no equilibrados a temperatura ambiente; en este caso, repita la prueba.
 - Se ha usado muy poco o nada de las soluciones CON-C y/o SUB-C.
- Ausencia de señales o señales débiles, excepto en la banda CC, se debe a:
 - La cantidad y/o la calidad del ADN extraído no permite una reacción de PCR eficiente; en este caso, se debe repetir la extracción de ADN.
 - Los reactivos AM-A y AM-B han sido invertidos, añadidos en cantidades inadecuadas o mezclados de manera inadecuada, en este caso preparar una nueva mezcla y repetir el ensayo.
 - Temperatura de incubación demasiado alta, en este caso debe repetirse la hibridación reversa.
- Tinción no homogénea, se debe a:
 - Tiras no sumergidas por completo en la bandeja de hibridación durante los pasos de incubación.
 - Bandeja no agitada adecuadamente; en este caso, debe repetirse la hibridación reversa.
- Fuerte color de fondo se debe a:
 - Las soluciones de trabajo del conjugado y/o sustrato fueron usados demasiado concentrados.
 - Los pasos de lavado no fueron realizados con el cuidado necesario.
 - Las soluciones de lavado no estuvieron temperadas adecuadamente: en este caso, debe repetirse la hibridación reversa.



F. Informe de resultados

Los resultados obtenidos por este método de ensayo deben ser registrados e ingresados al sistema informático NETLAB, o al sistema que haga de su vez, por el/la responsable del procesamiento de las muestras, para luego ser verificados por el personal autorizado designado por el/la responsable del laboratorio. Los/as usuarios/as autorizado/as a través de la página web del INS pueden acceder al NETLAB para visualizar los resultados, imprimir y entregar a su respectivo establecimiento de salud.

G. Limitaciones

- Este ensayo analiza la secuencia nucleotídica del ADN y no la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, es posible que mutaciones que no causen un cambio de aminoácido (mutaciones silenciosas) produzcan la ausencia de una de las bandas WT y den como resultado un 'falso resistente'. En casos raros se observó una mutación silenciosa en el codón 514 del gen *rpoB* que



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

conduce a la ausencia de la banda *rpoB* WT3. Por lo tanto, si se detecta una resistencia a R únicamente por la falta de una banda de *rpoB* WT3, se deben considerar los resultados de las pruebas de susceptibilidad fenotípica.

- Este ensayo solamente detecta aquellas resistencias del CMTB que tienen lugar en las regiones de los genes *rpoB*, *katG* e *inhA* de mayor asociación con la aparición de mutaciones que generan resistencia a nivel mundial. Por lo tanto, mutaciones asociadas a resistencias frente a R e H que afectan otros genes o regiones intergénicas no son detectados por este ensayo.
- Como cualquier sistema de detección basado en la hibridación, este ensayo contempla la posibilidad de que variaciones nucleotídicas en las regiones genéticas que fueron elegidas como lugar de unión de los cebadores y sondas de ADN puedan conducir a falsos resultados. Debido a la variabilidad existente en los genomas bacterianos es posible que ciertos subtipos puedan no ser detectados.
- La utilización de este ensayo está limitada a personal de laboratorio bien entrenado en el procedimiento de utilización del ensayo y familiarizadas con métodos de biología molecular.

6.6. ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y DE LA RESISTENCIA A FLUOROQUINOLONAS E INYECTABLES DE SEGUNDA LÍNEA

6.6.1. Fundamento

Se trata de un ensayo cualitativo *in vitro* basado en la tecnología de tiras de ADN y utilizado para la identificación del CMTB y detección de la resistencia a Fluoroquinolonas (Lfx y Mfx) e inyectables de segunda línea (Km, Am, Cm y Vm). El uso de este ensayo ayuda en la identificación de la TB-Pre-XDR. Este ensayo utiliza muestras de esputo con BK positiva, cultivos en medios sólidos (Löwenstein-Jensen, Ogawa) y cultivos en medios líquidos. La identificación de la resistencia a fluoroquinolonas se da por la detección de las principales mutaciones asociadas a resistencia de los genes *gyrA* y *gyrB* (que codifican la subunidad A y B de la enzima 'ADN girasa', respectivamente). El gen *gyrA* está determinado en la tira de ADN por la región que contiene: Una sonda de 'control de locus *gyrA*', 3 sondas WT (que permiten analizar la región génica comprendida entre los codones 85 y 96) y 6 sondas MUT específicas para las mutaciones de mayor prevalencia a nivel mundial Ala90Val (*gyrA* MUT1), Ser91Pro (*gyrA* MUT2), Asp94Ala (*gyrA* MUT3A), Asp94Asn/Asp94Tyr (*gyrA* MUT3B), Asp94Gly (*gyrA* MUT3C), Asp94His (*gyrA* MUT3D). La detección de mutaciones en el gen *gyrB* está determinada por la región que contiene: Una sonda de 'control de locus *gyrB*', una sonda WT (que permite analizar la región génica comprendida entre los codones 536 y 541) y 2 sondas MUT específicas para las mutaciones Asn538Asp (*gyrB* MUT1) y Glu540Val (*gyrB* MUT2). Para la identificación de resistencia a inyectables de segunda línea se analiza el gen *rrs* (que codifica la subunidad ribosomal '16S rRNA'), y para la detección particular de resistencia a kanamicina se analiza el gen *eis* (que codifica la proteína de 'mayor supervivencia intracelular'). La detección de mutaciones en el gen *rrs* está determinada en la tira de ADN por la región conteniendo: Una sonda de 'control de locus *rrs*', 2 sondas WT (que permiten analizar las posiciones nucleotídicas 1401, 1402 y 1484 del gen *rrs*) y 2 sondas MUT específicas para las mutaciones no codificantes a1401g (*rrs* MUT1) y g1484t (*rrs* MUT2). La detección de mutaciones en el gen *eis* está determinada en la tira de ADN por la región que contiene: Una sonda de 'control de locus *eis*', 3 sondas WT (que permiten analizar la región promotora -37 a -2 del gen), y una sonda específica para la mutación no codificante c-14t (*eis* MUT1) (Figura 3). La determinación de la resistencia por este ensayo se clasifica en resistencia detectada y resistencia inferida^{7,8}.



DR. L.F. DONAIRES



V. SUÁREZ

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

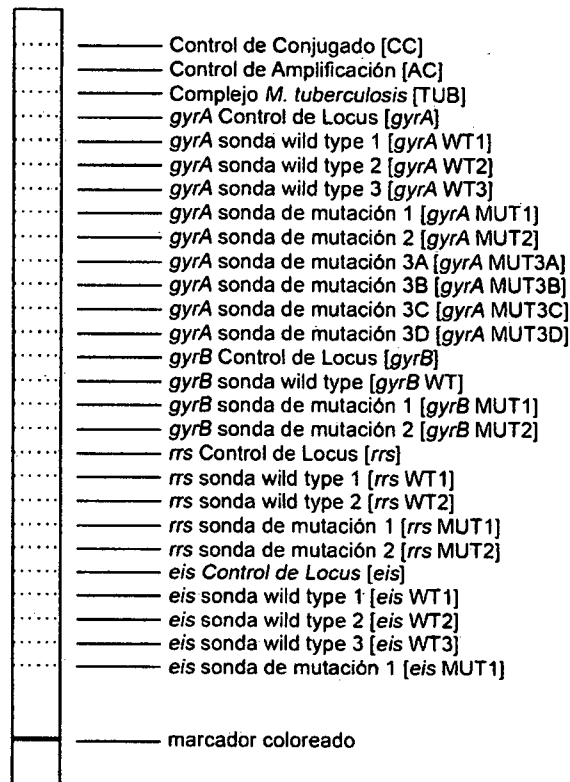


Figura 3. Representación de la distribución de sondas WT y MUT de las 4 regiones génicas analizadas en la tira de ADN del ensayo.

Fuente: Imagen adaptada de un ensayo de sonda en línea.

6.6.2. Equipos, materiales y reactivos

Para equipos, materiales y reactivos, revisar lo señalado en el punto 6.5.2 del subnumeral 6.5 del presente documento.

6.6.3. Cantidad y tipo de muestra

Para la determinación de cantidad mínima de muestra, interferencia y fuentes de variabilidad, revisar lo señalado en el punto 6.5.3 del subnumeral 6.5 del presente documento.

6.6.4. Procedimiento

Para la extracción de ADN, seguir los pasos del apartado B del punto 6.5.4 del subnumeral 6.5 del presente documento.

Para la amplificación, seguir los pasos del apartado C del punto 6.5.4 del subnumeral 6.5 del presente documento, teniendo en cuenta la siguiente excepción:

- Durante la 'Preparación de la mezcla maestra' se utilizan las mezclas AM-A y AM-B específicas del ensayo de sonda en línea para la identificación del CMTB y su resistencia a fluoroquinolonas e inyectables de segunda línea.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Para la hibridación, seguir los pasos del apartado D del punto 6.5.4 del subnumeral 6.5 del presente documento.

A. Interpretación de resultados

Consideraciones para la interpretación de los resultados (Figura 4):

- Pegar las tiras reveladas en la hoja de registro, teniendo en cuenta la alineación de las bandas CC y AC con las líneas respectivas del registro.
- Para una lectura precisa, utilizar una plantilla de interpretación de resultados y nivelar adecuadamente cada uno de los genes analizados mediante el alineamiento de las respectivas bandas de control de locus.
- Determinar el estado de resistencia de la tira revelada y anotar los resultados en las respectivas columnas de la hoja de registro.
- Para la interpretación de las tiras reveladas, es necesario tener en cuenta lo siguiente:

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

- Las presencias de la banda TUB y de las bandas WT y/o MUT de los genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis* determina que la muestra contiene una cepa perteneciente al CMTB.
- La presencia de la banda TUB y ausencias de las bandas WT y/o MUT, de los genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis* determina que hay una gran probabilidad de presencia de una cepa perteneciente al CMTB; sin embargo, es necesario repetir la prueba.
- La ausencia de la banda TUB y presencias de las bandas WT y/o MUT de los genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis* determina que hay una gran probabilidad de presencia de una cepa perteneciente al CMTB; sin embargo, es necesario repetir la prueba.
- Las ausencias de la banda TUB y de las bandas WT y/o MUT de los genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis*, determina que la muestra no contiene una cepa perteneciente al CMTB.

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

i) **Resistencia no detectada a fluoroquinolonas**

Se determina cuando:

- Todas las bandas WT del gen *gyrA* y *gyrB* son visibles y no se detecta la presencia de ninguna banda MUT (Figura 4 – resultados 1 y 7).

ii) **Resistencia no detectada a inyectables de segunda línea**

Se determina cuando:

- Todas las bandas WT del gen *rrs* son visibles y no se detecta la presencia de ninguna banda MUT (Figura 4 – resultados 1, 5 y 7).

iii) **Resistencia no detectada a kanamicina**

Se determina cuando:



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Todas las bandas WT del gen *eis* son visibles y no se detecta ninguna banda MUT (Figura 4 – resultados 1, 2, 3 y 4).

Nota: Sólo son consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que la banda AC.

c) **Resultado ‘Resistencia detectada/inferida’:** Resultado emitido cuando se evidencia una hibridación correcta de las sondas CC, AC y TUB, además de los siguientes casos:

i) **Resistencia detectada/inferida a fluoroquinolonas**

Se determina cuando:

- Alguna banda WT del gen *gyrA* o *gyrB* no es visible y se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia detectada) (Figura 4 – resultados 2, 3, 4 y 6).
- Alguna banda WT del gen *gyrA* o *gyrB* no es visible y no se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia inferida) (Figura 4 – resultado 5).

Las mutaciones que confieren resistencia a la Mfx se estratifican en mutaciones asociadas con resistencia de bajo nivel y con resistencia de alto nivel⁷ (Anexo 9). Los resultados deben notificarse según la siguiente jerarquía (donde el signo “>” significa “prima sobre”):

- Mutación detectada, asociada con resistencia de alto nivel > Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel > Mutación inferida, asociada con al menos resistencia de bajo nivel > Resistencia no detectada.

ii) **Resistencia detectada/inferida a inyectables de segunda línea**

Se determina cuando:

- Alguna banda WT del gen *rrs* no es visible y se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia detectada) (Figura 4 – resultados 2, 4 y 6).
- Alguna banda WT del gen *rrs* no es visible y no se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia inferida) (Figura 4 – resultado 3).

iii) **Resistencia detectada/inferida a kanamicina**

Se determina cuando:

- Alguna banda WT del gen *eis* no es visible y se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia detectada) (Figura 4 – resultado 6).
- Alguna banda WT del gen *eis* no es visible y no se detecta la presencia de la banda MUT correspondiente (Resistencia inferida) (Figura 4 – resultados 5 y 7).

Respecto a la resistencia a Am, se definen dos marcadores adicionales: a) la mutación *eis* c-14t, detectada por la sonda *eis* MUT1, y b) la *rrs* c1402t, inferida ante la ausencia de la banda *rrs* WT^{17,9} (Anexo 9).

Nota:

- Sólo deben ser consideradas como positivas aquellas bandas cuya intensidad sea igual o mayor que la banda AC.
- En raras ocasiones se pueden desarrollar tanto la banda WT como su respectiva banda MUT. Esto representa un resultado válido y puede ocurrir porque la muestra analizada contiene una



- cepa heterorresistente o contiene más de una cepa del CMTB (ej. debido a una infección mixta del paciente). En este caso, la muestra analizada se determina con resistencia detectada al respectivo antibiótico.
- La interpretación de la prueba para Km se determina como "Resistencia no detectada" ante la ausencia única de la banda eis WT3. Esto debido a que no hay pruebas claras de que la mutación *eis*-c-2a sea por sí sola un marcador válido de resistencia.
- Para la resistencia a Am:
 - o Si la resistencia es inferida, debido a la ausencia de hibridación de las sondas WT del gen *rrs* (es decir, que una o ambas bandas WT están ausentes), se recomienda repetir la prueba para confirmar el resultado.
 - o Si la resistencia es inferida, debido a la ausencia de hibridación de la sonda WT2 del gen *eis* y la banda MUT1 está ausente, se recomienda repetir la prueba para confirmar el resultado.

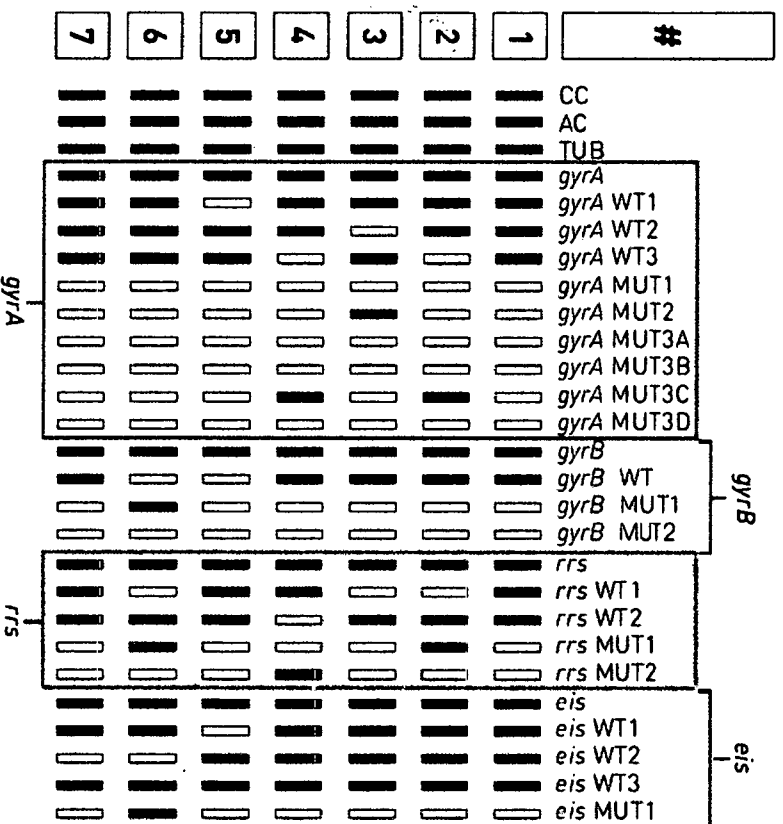
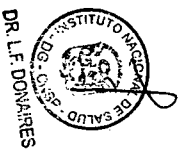


Figura 4. Interpretación de 7 resultados del ensayo.

- Resultado N° 1: Resultado resistencia no detectada para FLQs e ISLs.
- Resultado N° 2: Resultado resistencia detectada a FLQs (ausencia de la banda WT3 y presencia de la banda MUT3C del gen *gyrA*) y a Km, Am y Cm (ausencia de la banda WT1 y presencia de la banda MUT1 del gen *rrs*).
- Resultado N° 3: Resultado resistencia detectada a FLQs (presencia débil de la banda WT2 y presencia de la banda MUT2 del gen *gyrA*) y resistencia inferida a Km, Cm y Vm (ausencia de la banda WT1 y ausencia de las bandas MUT1 y MUT2 del gen *rrs*).



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Resultado N° 4: Resultado resistencia detectada a FLQs (ausencia de la WT3 y presencia de la MUT3C del gen *gyrA*) e ISLs (ausencia de la banda WT2 y presencia de la banda MUT2 del gen *rrs*).
- Resultado N° 5: Resultado resistencia inferida a FLQs (ausencia de la banda WT1 y ausencia de todas las bandas MUT del gen *gyrA*, así como ausencia de la banda WT y ausencia de todas las bandas MUT del gen *gyrB*), y a Km (ausencia de la banda WT1 y ausencia de la banda MUT1 del gen *eis*).
- Resultado N° 6: Resultado resistencia detectada a FLQs (ausencia de la banda WT y presencia de la banda MUT1 del gen *gyrB*) y a Km, Am y Cm (ausencia de la banda WT1 y presencia de la banda MUT1 del gen *rrs*).
- Resultado N° 7: Resultado resistencia inferida a Km (ausencia de la banda WT2 y ausencia de la banda MUT1 del gen *eis*).

Fuente: Imagen adaptada de un ensayo de sonda en línea.

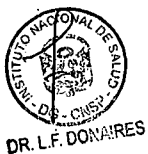
6.7. ENSAYO DE SONDA EN LÍNEA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y MICOBACTERIAS NO TUBERCULOSIS

6.7.1. Fundamento

Las pruebas de análisis genéticos de los ensayos MTBC y Mycobacterium CM (para micobacterias comunes) y AS (para micobacterias adicionales) son ensayos cualitativos *in vitro* basados en la tecnología de tiras de ADN usadas para la identificación de especies de micobacterias a partir de cultivos positivos líquidos o sólidos. Se realiza la diferenciación genética de las principales especies pertenecientes al CMTB (*Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium bovis* ssp. Bovis, *Mycobacterium bovis* ssp. Caprae, *Mycobacterium microti* y *Mycobacterium tuberculosis*/*Mycobacterium canettii*), además de una segura y rápida diferenciación de diversas especies de MNTs de importancia clínica¹⁰.

6.7.2. Ensayo de sonda en línea para identificación de micobacterias comunes

Prueba cualitativa que utiliza el ensayo Mycobacterium CM y permite la identificación genética del CMTB, así como de las siguientes especies de MNTs: *M. avium*, *M. chelonae*, el complejo *M. abscessus*, el grupo *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. marinum*/*M. ulcerans* y *M. xenopi* (Figura 5).



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

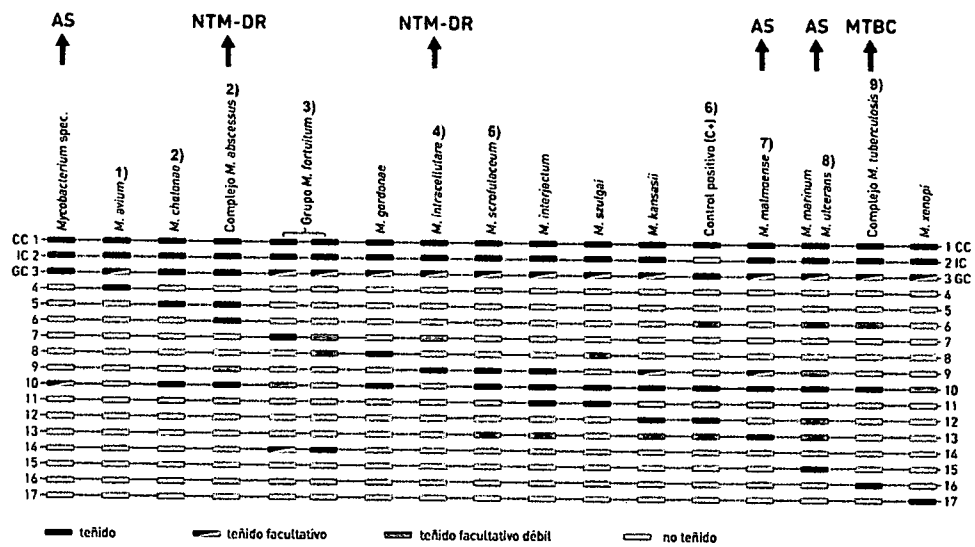


Figura 5. Interpretación de las tiras de ADN del ensayo Mycobacterium CM. **AS:** ensayo Mycobacterium AS. **MTBC:** ensayo Mycobacterium MTBC. **NTM-DR:** ensayo NTM-DR. Consideraciones:

- 1) No incluye otras especies del complejo *M. avium*.
- 2) *M. immunogenum* muestra el mismo patrón de bandas que *M. chelonae* o el complejo *M. abscessus*.

Nota: Los miembros del complejo *M. abscessus* se pueden diferenciar con la prueba molecular NTM-DR.

- 3) Del grupo *M. fortuitum*, sólo los siguientes miembros han sido probados: *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. alvei*, y *M. septicum*. No se ha probado si otros miembros del grupo *M. fortuitum* también muestran este patrón de bandas.
 - *M. fortuitum* muestra el patrón de bandas tal como se representa en la columna de la izquierda.
 - En la mayoría de los casos, *M. peregrinum* muestra el patrón de bandas tal como se representa en la columna de la derecha. Sin embargo, en casos raros, *M. peregrinum* puede mostrar el patrón de bandas tal como se representa en la columna de la izquierda.
 - *M. alvei* y *M. septicum* muestran el patrón de bandas tal como se representa en la columna de la derecha.
 - Especies que no pertenece al grupo *M. fortuitum*:
 - *M. mageritense* muestra el patrón de bandas tal como se representa en la columna de la izquierda sin la banda 14.
 - Las variantes raras de *M. smegmatis* también pueden mostrar el patrón de bandas tal como se representa en la columna de la izquierda sin la banda 14. Sin embargo, en este caso, la banda 7 sólo muestra una señal débil.

- 4) *M. marseillense* y *M. chimaera* (ambos miembros del complejo *M. avium*) muestran el mismo patrón de bandas que *M. intracellulare*.

Nota: *M. intracellulare* y *M. chimaera* se pueden diferenciar con la prueba molecular NTM-DR.

- 5) *M. paraffinicum* y *M. parascrofulaceum* muestran el mismo patrón de bandas que *M. scrofulaceum*.
- 6) El control positivo muestra un patrón de bandas *M. kansasii* sin la banda IC.
- 7) *M. haemophilum*, *M. palustre* y *M. nebraskense* muestran el mismo patrón de bandas que *M. malmoense*.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

Nota: *M. haemophilum*/*M. nebraskense* pueden ser identificadas con el ensayo Mycobacterium AS.

- 8) *M. ulcerans* puede ser identificado con el ensayo Mycobacterium AS.
- 9) Los miembros del complejo *M. tuberculosis* se pueden diferenciar con el ensayo CMTB.

Fuente: Imagen adaptada de un ensayo de sonda en línea.

6.7.3. Ensayo de sonda en línea para la identificación de micobacterias adicionales

Prueba cualitativa que utiliza el ensayo Mycobacterium AS y permite la identificación genética molecular de las siguientes especies de MNTs: *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* y *M. shimoidei* (Figura 6).

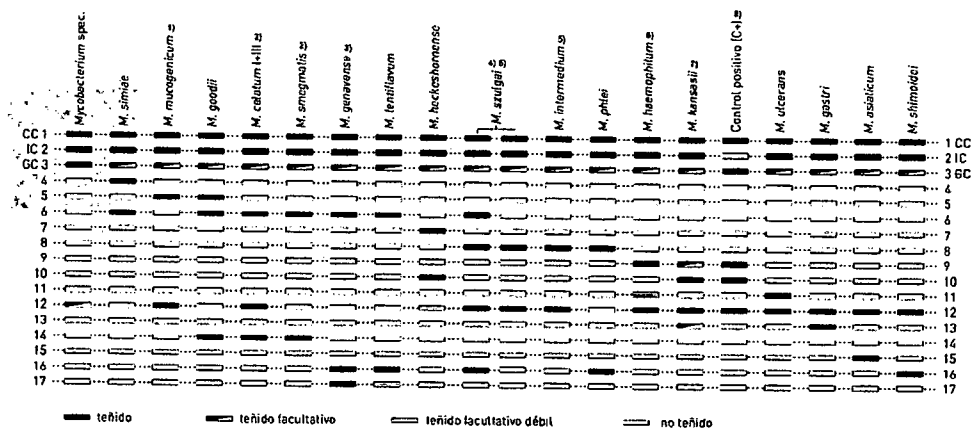


Figura 6. Interpretación de las tiras de ADN del ensayo Mycobacterium AS.
 Consideraciones:

- 1) Para *M. mucogenicum*, la intensidad de la banda 12 puede ser más débil que la de la banda IC.
- 2) Si se utiliza un medio líquido, las bacterias contaminantes pueden generar patrones de bandas positivos falsos para *M. celatum* o *M. smegmatis*. Por tanto, el patrón de bandas que indica la presencia de estas 2 especies sólo es válido cuando el ADN se ha extraído de bacterias cultivadas en medio sólido (colonias individuales/colonias morfológicamente idénticas).
- 3) *M. triplex* muestra el mismo patrón de bandas que *M. genavense*.
- 4) Debido a variaciones de secuencia existen 2 patrones de bandas diferentes para *M. szulgai*.
- 5) *M. szulgai* y *M. intermedium* se pueden diferenciar con el ensayo Mycobacterium CM.
 - *M. szulgai* muestra bandeo en las bandas 1, 2, 3, 10 y 11, y
 - *M. Intermedium* muestra bandeo en las bandas 1, 2, 3 y 10.
- 6) *M. nebraskense* muestra el mismo patrón de bandas que *M. haemophilum*.
- 7) Debido a variaciones de secuencia existen cuatro patrones de bandas diferentes para *M. kansasii*.
- 8) El control positivo muestra el patrón de bandas de *M. kansasii* sin la banda IC; la intensidad de la banda 9 puede ser menor que la de las bandas 10 y 12.

Fuente: Imagen adaptada de un ensayo de sonda en línea.



6.7.4. Ensayo de sonda en línea para la identificación de micobacterias pertenecientes al complejo Mycobacterium tuberculosis

Prueba cualitativa que utiliza el ensayo MTBC y permite la diferenciación de las siguientes especies pertenecientes al CMTB: *M. tuberculosis*/*M. Canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* ssp. *Bovis*, *M. bovis* ssp. *Caprae* y *M. bovis* BCG (Figura 7).

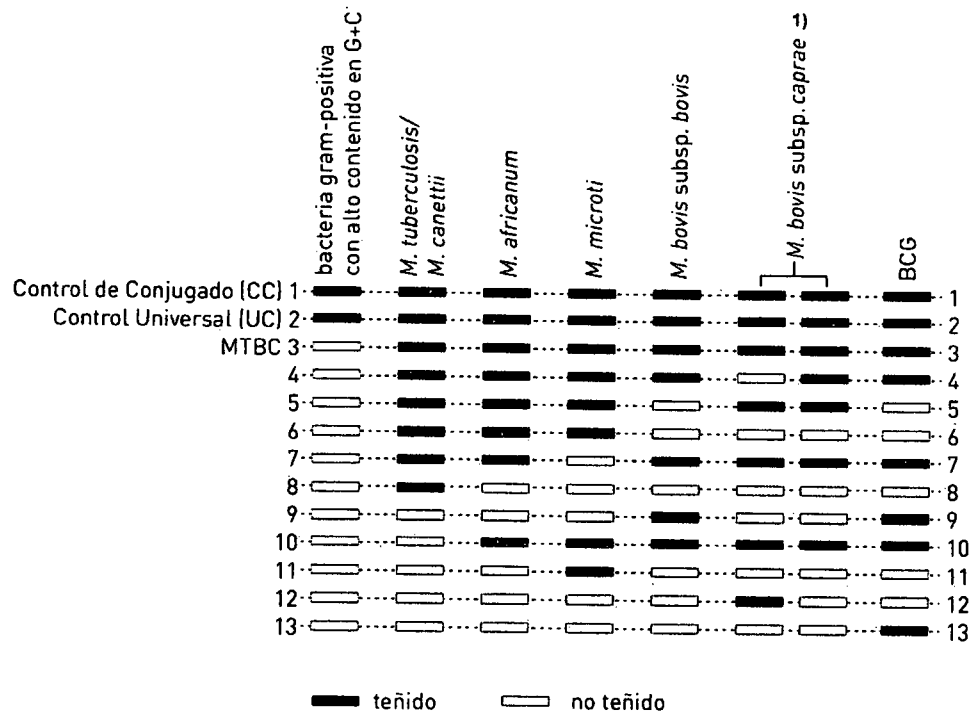


Figura 7. Interpretación de las tiras de ADN del ensayo MTBC.

Consideración:

- 1) Aproximadamente el 5% de las subespecies de *M. bovis caprae* muestran un patrón de bandas de acuerdo con la columna de la derecha.

Fuente: Imagen adaptada de un ensayo de sonda en línea.



6.7.5. Equipos, materiales y reactivos

Respecto a los equipos, materiales y reactivos, revisar lo señalado en el punto 6.5.2 del subnumeral 6.5 del presente documento. Adicionalmente, para Mycobacterium CM y AS se contará con los siguientes reactivos:

- IC
- C+

6.7.6. Cantidad y tipo de muestra

Cultivo puro sospechoso de *Mycobacterium spp* aislado en medio de cultivo sólido (Löwestein-Jensen, Ogawa, Middlebrook) o líquido.



6.7.7. Procedimiento

A. Extracción de ácido desoxirribonucleico

Seguir los pasos del apartado B del punto 6.5.4 del subnumeral 6.5 del presente documento. Para los casos de los ensayos Mycobacterium CM y AS, tome en cuenta las siguientes variaciones:

- Preparar la mezcla A-LYS/IC que contenga 100µl de A-LYS y 2µl de IC (específicos de los ensayos Mycobacterium CM y Mycobacterium AS, según sea el caso) para cada muestra. Mezclar la solución A-LYS/IC con ayuda de un vórtex.
- Para la muestra de control negativo, dispensar 100µl de A-LYS/IC en un tubo de microcentrifuga vacío y seguir con el procesamiento correspondiente

B. Amplificación

Seguir los pasos del apartado C del punto 6.5.4 del subnumeral 6.5 del presente documento. Tome en cuenta la siguiente variación:

- Durante la 'Preparación de la Mezcla Maestra' se utiliza las mezclas AM-A y AM-B específicos de los ensayos MTBC, Mycobacterium CM y Mycobacterium AS, según sea el caso.
- Para los ensayos Mycobacterium CM y AS, durante el 'Cargado de ADN' se debe adicionar 5µl de C+ en un tubo conteniendo 45µl de la mezcla maestra correspondiente, a fin de contar con un control positivo.

C. Interpretación de resultados

- Tener en cuenta la alineación de las bandas CC, IC, UC y GC con las respectivas líneas del formato. Pegar las tiras y almacenar protegiéndolas de la luz. Para una lectura precisa utilizar una plantilla alineando separadamente con las bandas control previamente descritas.
- Cada tira del ensayo Mycobacterium CM/AS tiene un total de 17 zonas de reacción y para el ensayo MTBC 13 zonas de reacción (Figura 8).

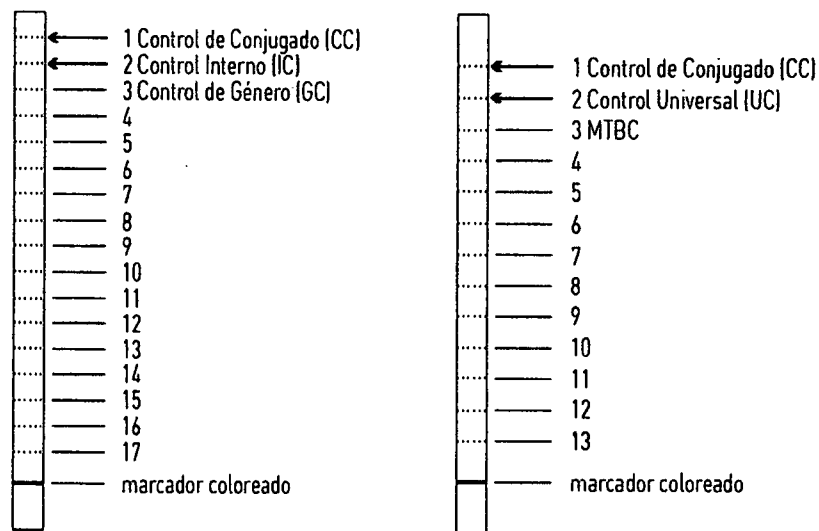


Figura 8. Representación de la distribución de sondas analizadas en la tira de ADN de los ensayos CM/AS (izquierda) y MTBC (derecha).

Fuente: Imagen adaptada a partir de ensayos de sonda en línea.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Anotar el número de las bandas positivas de la zona de identificación y determinar la especie con ayuda de la tabla de interpretación.
- Para los ensayos Mycobacterium CM y AS:
 - En general, solamente han de considerarse aquellas bandas cuyas intensidades sean tan fuertes, o más fuertes, que la intensidad de la banda IC.
 - Un resultado negativo es válido cuando solo aparecen las bandas CC e IC.
 - En caso de un resultado positivo del ensayo, la banda IC puede ser débil e incluso puede llegar a desaparecer completamente. Esto puede ser debido a reacciones de competencia durante la amplificación. En este caso, el ensayo se realizó correctamente y no tiene que ser repetido.
 - La banda IC no se muestra en el control positivo.
 - La ausencia de la banda IC en caso de un ensayo negativo, indica errores durante la extracción de DNA, errores durante la preparación y/o la realización de la reacción de PCR, o la presencia en la muestra de inhibidores de la PCR. En este caso, el resultado no es válido y el ensayo ha de ser repetido con la muestra respectiva.
 - La intensidad de la banda GC depende de la especie de micobacteria.
 - La banda GC puede teñir débilmente o desaparecer en el caso que se manifieste un patrón de bandeado específico de especie, por lo que el resultado del ensayo es válido.
- Para el ensayo MTBC:
 - Solamente se consideran aquellas bandas cuyas intensidades son tan fuertes o más fuertes que la intensidad de la banda UC.
 - Un resultado negativo es válido cuando solo aparecen las bandas CC y UC.
 - Si se visualizan las bandas CC y UC, pero el restante esquema de bandas no puede ser asignado a una micobacteria específica, entonces se deben aplicar métodos adicionales para identificar la especie bacteriana correspondiente.

6.8. AMPLIFICACIÓN AUTOMATIZADA DEL ÁCIDO NUCLEICO EN TIEMPO REAL ALTAMENTE SENSIBLE (ULTRA) PARA LA DETECCIÓN SIMULTÁNEA DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y DE LA RESISTENCIA A RIFAMPICINA

6.8.1. Fundamento

El método de amplificación automatizada del ácido nucleico en tiempo real altamente sensible (ultra) utiliza la PMMA automatizada e integra el procesamiento de las muestras, la amplificación de ácidos nucleicos y la detección de las secuencias objetivo en muestras simples o complejas mediante Q-PCR y detección del pico de fusión. El sistema requiere el uso de cartuchos autónomos desechables, los cuales confieren un riesgo mínimo de contaminación cruzada entre muestras.

En el año 2017, la OMS recomendó el uso de un nuevo cartucho de última generación, con la finalidad de superar las limitaciones en la sensibilidad que tiene el cartucho previo utilizado para el diagnóstico de la TB y resistencia a R. Es así que este cartucho actualmente incorpora mejoras en la detección del complejo MTB, así como para la determinación de la resistencia a la R¹¹.

El nuevo cartucho utiliza la misma PMMA que el cartucho previo. El nuevo cartucho ultra incorpora 2 blancos de amplificación multicopian (los genes IS6110



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

e IS1081) y tiene una cámara de reacción de ADN más grande (50µl de PCR frente a 25µl del sistema previo). Además, el sistema automatizado ultra también incorpora completamente la amplificación de ácidos nucleicos anidados, ciclos térmicos más rápidos y, fluidos y enzimas mejoradas. Esto ha dado como resultado que el sistema ultra tenga un límite de detección de 16 UFC bacterianas por mililitro (en comparación con 114 UFC/ml para el sistema previo). Asimismo, para mejorar la precisión de la detección de la resistencia a la R, el sistema automatizado ultra incorpora un análisis basado en la temperatura de fusión en lugar de la PCR en tiempo real. Específicamente, 4 sondas identifican mutaciones de resistencia a R en la RDRR del gen *rpoB* mediante la detección de cambios en la temperatura de fusión en comparación con el valor de referencia de tipo salvaje¹².

6.8.2. Equipos, materiales y reactivos

A. Equipos

- Agitador tipo vórtex.
- Autoclave.
- CBS clase II tipo A2 (su uso depende del tipo de muestras a procesar).
- Centrífuga (su uso depende del tipo de muestras a procesar).
- Cronómetro digital.
- Equipo automatizado de amplificación de ácido nucleico en tiempo real.
- Laptop/sistema de cómputo básico.
- Lector de código de barras y códigos QR.
- Refrigeradora (2-8°C).

B. Materiales

- Bolsas de bioseguridad para descarte.
- EPP correspondiente a Laboratorios de tuberculosis de bajo riesgo.
- Gasa o paño para limpieza de superficies.
- Gradillas para tubos de 15ml.
- Guantes descartables sin talco.
- Papel absorbente plastificado.
- Papel toalla.
- Pipetas de transferencia descartables de 3ml.
- Plumón marcador.
- Programa informático para ejecutar el diagnóstico
- Tubos de centrifuga estéril de polipropileno de 15ml, base cónica.

C. Reactivos

Específicos del ensayo:

- Cartucho de procesamiento.
- SR.

Generales del laboratorio:

- Cloro al 1% (preparado dentro de las 24 horas).
- Etanol al 70%.
- Solución salina/tampón fosfato.



6.8.3. Cantidad de muestra

El volumen mínimo requerido de muestra de esputo para realizar la prueba es de 1ml; sin embargo, se debe recolectar al menos 2ml adicionales que serán usados para el cultivo. Para el caso de las muestras pulmonares no esputo, así como extrapulmonares se deben seguir las recomendaciones vigentes establecidas por la OMS.

6.8.4. Procedimiento

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

A. Digestión e inactivación de la muestra (Anexo 10).

- Colocarse el EPP correspondiente.
- Ingresar al laboratorio.
- Limpiar la superficie del área de trabajo con etanol al 70%.
- Dejar que el cartucho alcance la temperatura de ambiente.
- Evaluar macroscópicamente las muestras, verificar códigos, calidad y cantidad.
- Registrar.
- Rotular un tubo de centrifuga de 15ml con el código de la muestra y verificar que se encuentre correctamente etiquetado.
- Si las muestras estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases durante 20 minutos antes de comenzar a abrirlos.
- Con la ayuda de una pipeta de transferencia descartable trasladar como mínimo 1ml de esputo al tubo de centrifuga de 15ml.
- Adicionar un volumen duplicado de SR al tubo con la muestra (uno de muestra y dos de SR), cerrar el tubo y agitar vigorosamente de 10 a 20 veces o usar un vórtex por 10 a 15 segundos.
- Incubar la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 – 28°C).
- Agitar vigorosamente de 10 a 20 veces o usar un vórtex por 10 a 15 segundos.
- Incubar la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente (20 – 28°C).

Nota: Tiempo de estabilidad del preparado es de 4 horas.

B. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real. Preparación del cartucho (Anexo 10).

- Verificar el buen estado del cartucho, el cual se debe encontrar sin roturas ni derrames que haga sospechar o dudar sobre la integridad del mismo.
- Rotular o pegar el código de barras del cartucho con el código de la muestra correspondiente.
- Abrir la tapa del cartucho y la tapa del tubo de centrifuga cónico con la muestra digerida e inactivada.
- Utilizando una pipeta de transferencia, aspirar hasta la marca de la pipeta y, lentamente, transferir en posición vertical la muestra procesada dentro del cartucho (evitar la generación de burbujas). Luego, asegurar la tapa del cartucho.

Nota: Comenzar la prueba dentro de los 30 minutos de haber agregado la muestra al cartucho



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

- Limpiar el exterior del cartucho con cloro al 1% sin agitar, evitando tocar la parte posterior del mismo (zona de amplificación), el código de muestra y el código QR.
- Encender el equipo automatizado y después la laptop que contiene el programa para ejecución del diagnóstico.
- En el programa de ejecución del diagnóstico presionar la opción 'Crear prueba', y luego completar los siguientes datos:
 - Identificador del paciente (nombre del paciente).
 - Identificador de la muestra (código de laboratorio de la muestra).
 - Identificador del cartucho (código QR del cartucho).
 - Identificador del módulo en el que se va a colocar el cartucho (esto ocurre de manera automática; sin embargo, también puede ser ingresado manualmente).
 - Tipo de muestra.
 - Observaciones importantes sobre la muestra o el paciente.
- En el equipo automatizado, abrir el módulo seleccionado (aquel señalado con la presencia de una luz intermitente), colocar el cartucho en el interior y cerrar el módulo.
- Iniciar el programa computacional de diagnóstico, seleccionar la opción 'Iniciar prueba', y esperar el tiempo necesario hasta que la prueba termine.
 Nota: Durante el tiempo de procesamiento de la muestra en el equipo automatizado, se puede monitorear el proceso a través de la opción 'Comprobar estado' del programa computacional de diagnóstico.
- Terminado el proceso, verificar los datos, el resultado y la gráfica generada de las sondas, a través de la opción 'Ver resultados' del programa computacional de diagnóstico.
- Retirar el cartucho utilizado y descartarlo en una bolsa de bioseguridad teniendo los cuidados necesarios para evitar algún derrame.
- El cartucho debe ser esterilizado mediante autoclave para su posterior eliminación.

6.8.5. Informe de resultados

Los resultados obtenidos por este método deben ser registrados e ingresados al sistema informático NETLAB, o al sistema que haga de su vez, por el responsable del procesamiento de las muestras, para luego ser verificados por el personal autorizado designado por el/la responsable del laboratorio. Los/as usuarios/as autorizado/as a través de la página web del INS pueden acceder al NETLAB para visualizar los resultados, imprimir y entregar a su respectivo establecimiento de salud.



6.8.6. Interpretación de resultados (Anexo 11)

Los resultados se interpretan de manera inmediata por el equipo automatizado y se muestran en la ventana de ver resultados (*view results*).

La prueba de amplificación automatizada de ácido nucleicos en tiempo real emite diferentes resultados los cuales, en conjunto con sus respectivas interpretaciones, se describen en la siguiente tabla ¹⁶:

RESULTADO	INTERPRETACIÓN
MTB: DETECTADO ALTO Resistencia a R: DETECTADA	La muestra contiene la secuencia objetivo de MTB:



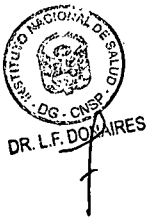
DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

MTB: DETECTADO MEDIO Resistencia a R: DETECTADA	<ul style="list-style-type: none"> - Se ha detectado una mutación en la secuencia objetivo del gen <i>rpoB</i>. - SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control. - Comprobación de la sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.
MTB: DETECTADO BAJO Resistencia a R: DETECTADA	
MTB: DETECTADO MUY BAJO Resistencia a R: DETECTADA	
MTB: DETECTADO ALTO Resistencia a R: NO DETECTADA	<p>La muestra contiene la secuencia objetivo de MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> - No se ha detectado ninguna mutación en la secuencia objetivo del gen <i>rpoB</i>. - SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control. - Comprobación de sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.
MTB: DETECTADO MEDIO Resistencia a R: NO DETECTADA	
MTB: DETECTADO BAJO Resistencia a R: NO DETECTADA	
MTB: DETECTADO MUY BAJO Resistencia a R: NO DETECTADA	
MTB: DETECTADO ALTO Resistencia a R: INDETERMINADA	<p>La muestra contiene la secuencia objetivo de MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> - No se pudo determinar la resistencia a R debido a picos de fusión no válidos. - SPC: NA (no aplicable). No se requiere una señal SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control. - Comprobación de sonda: SUPERADO (PASS). Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.
MTB: DETECTADO MEDIO Resistencia a R: INDETERMINADA	
MTB: DETECTADO BAJO Resistencia a R: INDETERMINADA	
MTB: DETECTADO MUY BAJO Resistencia a R: INDETERMINADA	
MTB: Trazas DETECTADO Resistencia a R: INDETERMINADA	<p>La muestra contiene la secuencia objetivo de MTB:</p> <ul style="list-style-type: none"> - No se puede determinar la resistencia a R debido a una detección insuficiente de la señal. - SPC: NA (no aceptable). No se requiere una señal SPC porque la amplificación de MTB puede competir con este control. - Comprobación de la sonda SUPERADO. Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS**

MTB: NO DETECTADO	<p>No se ha detectado la secuencia objetivo de MTB en la muestra:</p> <ul style="list-style-type: none"> - SPC: SUPERADO. El SPC cumplió los criterios de aceptación. - Comprobación de sonda: SUPERADO. Todos los resultados de la comprobación de la sonda son aceptables.
NO VÁLIDO	<p>No puede determinarse la presencia o ausencia de MTB. El SPC no satisface los criterios de aceptación, la muestra no se procesó correctamente o la PCR se ha inhibido. Repita la prueba.</p> <ul style="list-style-type: none"> - MTB NO VALIDO: No se puede determinar la presencia o ausencia de la secuencia objetivo de MTB. - SPC: INCORRECTO. El resultado de detección de MTB es negativo, y el valor Ct del SPC no está dentro del intervalo válido. - Comprobación de sonda: SUPERADO. Todos los resultados de la comprobación de sonda son aceptables.
ERROR	<p>No puede determinarse la presencia o ausencia de MTB. Repita la prueba.</p> <ul style="list-style-type: none"> - MTB: SIN RESULTADO. - SPC: SIN RESULTADO. - Comprobación de sonda INCORRECTO. Todos o uno de los resultados de la comprobación de la sonda no supera la prueba. <p>Nota: Si la comprobación de la sonda se superó, el error se debe a un fallo en los componentes del sistema.</p>
SIN RESULTADO	<p>No puede determinarse la presencia o ausencia de MTB. Repita la prueba.</p> <p>SIN RESULTADO indica que no se ha recogido suficientes datos. Por ejemplo, si el operador detuvo una prueba en curso.</p> <ul style="list-style-type: none"> - MTB: SIN RESULTADO. - SPC: SIN RESULTADO. - Comprobación de sonda: NA (no aplicable)



6.9. CONTROL DE CALIDAD DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE TUBERCULOSIS

6.9.1. Ensayo de sonda en línea para la identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y de la resistencia a rifampicina e isoniacida

A. Control de calidad interno

El control de calidad interno es realizado para cada muestra mediante la verificación en las tiras de ADN de las bandas AC y CC.

B. Control de calidad externo

El control de calidad externo se realiza en coordinación con el LRNM o el que haga sus veces del INS.

6.9.2. Ensayo de sonda en línea para la identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y de la resistencia a fluoroquinolonas e inyectables de segunda línea

A. Control de calidad interno

El control de calidad interno es realizado para cada muestra mediante la verificación en las tiras de ADN de las bandas AC y CC.

B. Control de calidad externo

El control de calidad externo se realiza en coordinación con el LRNM o el que haga sus veces del INS, siguiendo las guías actualizadas.

6.9.3. Ensayo de sonda en línea para la identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y *Micobacterias* no *tuberculosis*

A. Control de calidad interno

El control de calidad interno es realizado para cada muestra mediante la verificación en las tiras de ADN de las bandas CC, IC, UC y GC.

B. Control de calidad externo

El control de calidad externo se realiza en coordinación con el LRNM o el que haga sus veces del INS, siguiendo las guías actualizadas.

6.9.4. Amplificación automatizada del ácido nucleico en tiempo real altamente sensible (Ultra) para la detección simultánea del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y de la resistencia a rifampicina

A. Control de calidad interno

El control de calidad interno es realizado para cada muestra mediante la verificación de las sondas PCC y SPC.

B. Control de calidad externo

El control de calidad externo se realiza en coordinación con el LRNM o el que haga sus veces del INS.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**

VII. RESPONSABILIDADES

7.1. Nivel nacional

El INS, a través del LRNM o el que haga sus veces del Centro Nacional de Salud Pública o el que haga sus veces, es responsable de la difusión del presente documento técnico, así como de brindar asistencia técnica y supervisar el cumplimiento de la misma.

7.2. Nivel regional

Las DIRIS, DIRESA, GERESA, o las que hagan sus veces, a través de los laboratorios correspondientes, son responsables de la difusión, capacitación, supervisión, asistencia técnica y evaluación del cumplimiento del presente documento técnico en de su jurisdicción.

7.3. Nivel local

Corresponde a las a los laboratorios de los establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo la aplicación e implementación del presente documento técnico.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Organización Mundial de la Salud. 2005. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Tercera Edición. Ginebra.
- 2) Ministerio de Salud - INS. 2005. Manual de Procedimientos - Bioseguridad en los Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos. Serie de Normas Técnicas N° 18. Tercera edición. Lima.
- 3) Organización Panamericana de la Salud. 2022. Manual de Seguridad en el Laboratorio. Edición global. Washington, D.C.
- 4) Instituto Nacional de Salud. 1997. Manual de procedimientos de laboratorio para la obtención y envío de muestras (I) 2ª Ed. Serie de Normas Técnicas N° 15. Lima.
- 5) Organización Mundial de la Salud. 2019. Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas 2019–2020.
- 6) World Health Organization. 2016. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to isoniazid and rifampicin: policy update.
- 7) Organización Panamericana de la Salud. 2022. Pruebas con sondas lineales para detectar la tuberculosis farmacorresistente. Manual sobre interpretación y notificación de resultados dirigidos al personal médico y de laboratorio.
- 8) World Health Organization. 2016. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: WHO policy guidance.
- 9) World Health Organization. 2021. Catalogue of mutations in Mycobacterium tuberculosis complex and their association with drug resistance.
- 10) Richter. E, Sabine R-G, and Hillemann. D. 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. Journal of Clin Microbiology.; 44(5): 1769–1775.
- 11) World Health Organization. 2017. WHO Meeting Report of a Technical Expert Consultation: Non-inferiority analysis of Xpert MTB/RIF Ultra compared to Xpert MTB/RIF.
- 12) World Health Organization. 2021. Web Annex. Study report. In: Use of Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra on GeneXpert 10-colour instruments: WHO policy statement.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**

IX. ANEXOS

Anexo 1: Desinfectantes.

Anexo 2: Preparación de solución de digestión-descontaminación.

Anexo 3: Preparación del tampón fosfato.

Anexo 4: Proceso de digestión y descontaminación de la muestra de esputo.

Anexo 5: Proceso de extracción de ácido desoxirribonucleico.

Anexo 6: Preparación de mezcla maestra de Reacción en Cadena de la Polimerasa (12 muestras).

Anexo 7: Procedimiento de cargado de ácido desoxirribonucleico y amplificación.

Anexo 8: Procedimiento de hibridación reversa.

Anexo 9: Estratificación de la resistencia para isoniacida y moxifloxacina en mutaciones asociadas con "resistencia de bajo nivel" o "resistencia de alto nivel", y clasificación de la resistencia para amikacina.

Anexo 10: Proceso del ensayo "Amplificación automatizada del ácido nucleico en tiempo real altamente sensible": Inactivación y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Anexo 11: Resultados de la prueba molecular "Amplificación automatizada del ácido nucleico en tiempo real altamente sensible".

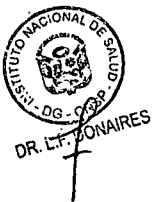


DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

ANEXO 1: Desinfectantes.

Las soluciones desinfectantes registradas cuyo uso se recomienda en los laboratorios de tuberculosis son los que contienen compuestos fenólicos sintéticos, cloro o alcohol. Se seleccionan atendiendo al material que se va a desinfectar.

DESINFECTANTE	DESCRIPCIÓN
COMPUESTOS FENÓLICOS SINTÉTICOS	<p>Los compuestos fenólicos sintéticos se emplean a una concentración del 5% en agua. Usar solo compuestos fenólicos sintéticos preparados cada 2 o 3 días.</p> <p>Tiempo de contacto: 15 minutos para la desinfección habitual y 30 minutos para derrames con concentraciones elevadas de bacilos.</p> <p>Riesgos para la salud: La inhalación y la exposición dérmica estos compuestos son sumamente irritantes para la piel, ojos y mucosas. Carcinógeno potencial. Tóxico si se ingiere.</p>
CLORO	<p>Se usa 0,5-1% cloro libre. La solución de hipoclorito de sodio (lejía doméstica) de buena calidad contiene 5 g/L (5%) de cloro, pero puede variar entre el 3 y 7%. No exponerla a la luz y mantenerla en un lugar fresco y con tapa fuertemente cerrada para evitar que se deteriore. Verificar en la fecha de envasado para su control al momento de adquirirla. Las diluciones deben ser realizadas diariamente, debido a que la actividad se pierde rápidamente. Las soluciones no deben introducirse en la autoclave. Es sumamente corrosiva para el metal, incluso el acero; si se usa en estas superficies se debe de enjuagar después con agua estéril o alcohol al 70%. Intervalo óptimo de pH 6-8.</p> <p>Tiempo de contacto: 15 minutos para la desinfección habitual y 30 minutos para derrames con concentraciones elevadas de bacilos.</p> <p>Riesgos para la salud: Causa irritación pulmonar, tos por el gas de cloro. Irritante para piel y ojos.</p>



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

ALCOHOL	<p>Los alcoholes, como el etanol e isopropanol, se utilizan diluidos al 70% v/v. Son sustancias volátiles e inflamables que no deben usarse cerca de una llama. Las soluciones se almacenan 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% se puede usar para la desinfección de la superficie de mesas de trabajo y la CSB. Una de las grandes ventajas de las soluciones acuosas de alcohol es que no deja residuo en los objetos tratados. Daña la goma y los plásticos.</p> <p>Tiempo de contacto: Limpiar la superficie con un paño y dejar secar.</p> <p>Riesgos para la salud: Irritación ocular.</p>
----------------	--



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**

ANEXO 2: Preparación de solución de digestión-descontaminación.

Volumen total de solución de digestión-descontaminación (ml)	Volumen soluciones (ml)		Sal NALC (g)
	Solución A: Hidróxido de sodio 4% w/v (*)	Solución B: Citrato de Sodio 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

(*) Disolver 4 g de Hidróxido de sodio en 100ml de agua destilada.

(**) Disolver 2.9 g de Citrato trisódico dihidratado en 100ml de agua destilada.

- Mezclar volúmenes iguales (proporción 1:1) de las soluciones A y B, y homogenizar. Esterilizar en autoclave (121°C por 15 minutos).
- Cada vez que se realice el proceso de descontaminación es necesario añadir justo antes del proceso 0.25 g de NALC por cada 50ml de solución. Disolver la sal con movimientos suaves de rotación para evitar perder la actividad mucolítica.



ANEXO 3: Preparación del tampón fosfato.

Solución A

Reactivo	Cantidad
Fosfato disódico anhidro	9.47g
Agua destilada	1000ml

Solución B

Reactivo	Cantidad
Fosfato monopotásico	9.07g
Agua destilada	1000ml

- Mezclar las soluciones A y B en volúmenes iguales (proporción 1:1), y homogenizar.
- Medir el pH y ajustar hasta el valor de 6.8.

Nota: Añadir la solución A para aumentar el pH o la solución B para disminuir el pH.

- Dispensar en un recipiente con los volúmenes deseados para el proceso de descontaminación y esterilizar en la autoclave (121°C por 15 minutos).



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

ANEXO 4: Proceso de digestión y descontaminación de la muestra de esputo.



1. Muestra recibida correctamente preservada



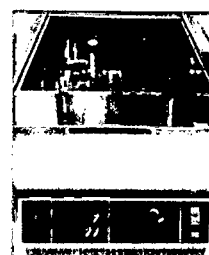
2. Tomar 3ml de muestra y agregarlo a un tubo estéril



3. Agregar 3ml de solución de descontaminación



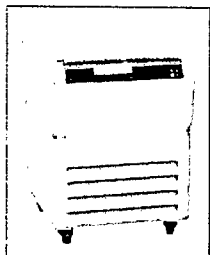
4. Mezclar en vórtex



5. Incubar en baño maría a 37°C por 15 minutos



6. Agregar tampón fosfato hasta 50ml



7. Centrifugar a 3000 g por 15 minutos



8. Descartar el sobrenadante



9. Resuspender con 1.5ml de tampón fosfato



10. Muestras descontaminada y concentrada



DR. L.F. DONAIRES

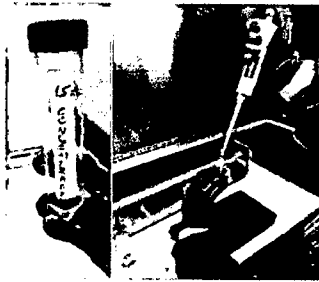
Fuente: Imágenes obtenidas en el LRNM del INS.



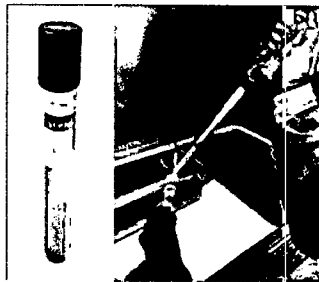
V. SUÁREZ

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

ANEXO 5: Proceso de extracción de ácido desoxirribonucleico.



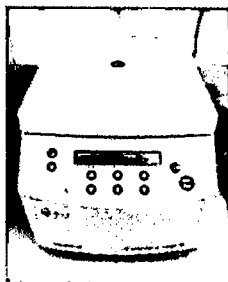
1a. Utilizar 500µl de muestra concentrada (proseguir al paso 2)



1b. Utilizar 1ml de cultivo líquido (proseguir al paso 2)



1c. Utilizar cultivo sólido y agregarlo en un tubo que contiene 100µl de A-LYS (proseguir al paso 4)



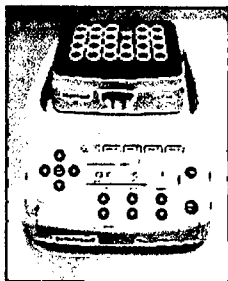
2. Centrifugar a 10000 g por 15 minutos



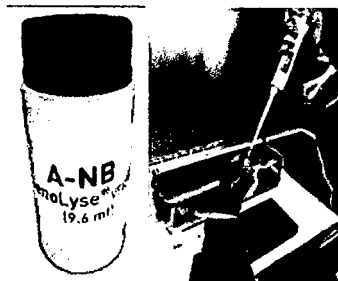
3. Eliminar el sobrenadante y agregar 100µl de A-LYS



4. Mezclar por vórtex y centrifugar



5. Inactivar a 95°C por 5 minutos



6. Agregar 100µl de A-NB



7. Centrifugar a 13000 g por 5 minutos



8. ADN extraído



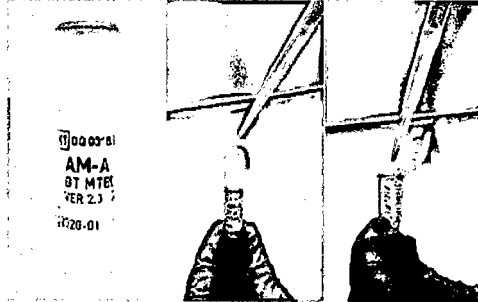
DR. L.F. DONAIRES



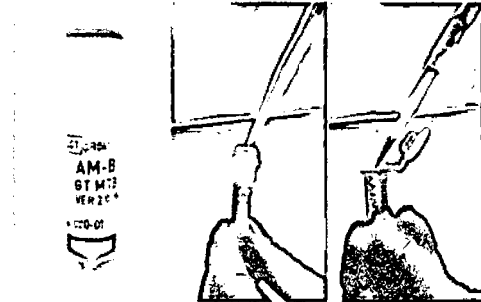
Fuente: Imágenes obtenidas en el LRNM del INS.

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS

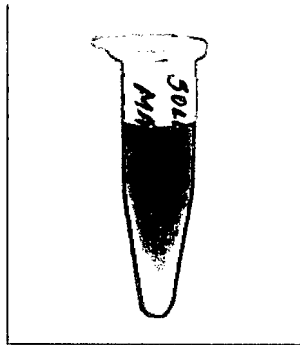
ANEXO 6: Preparación de mezcla maestra de Reacción en Cadena de la Polimerasa (12 muestras).



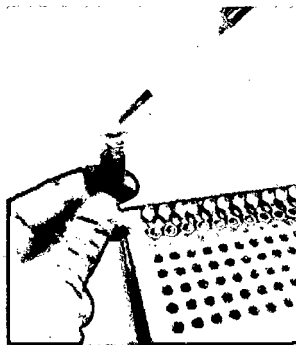
1. Dispensar 120µl de solución AM-A



2. Adicionar 420µl de la solución AM-B y mezclar por inversión



3. Solución madre para 12 muestras



4. Dispensar 45µl



5. Tubo de PCR con 45µl de mezcla maestra

Fuente: Imágenes obtenidas en el LRNM del INS.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS

**ANEXO 7: Procedimiento de cargado de ácido desoxirribonucleico y
amplificación.**



1. Agregar 5µl de ADN problema al tubo de PCR con 45µl de mezcla maestra y combinar suavemente



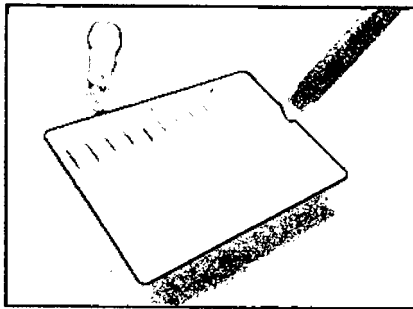
2. Colocar en el termociclador y ejecutar el programa de ciclado correspondiente (esputo o cultivo)

Fuente: Imágenes obtenidas en el LRNM del INS.

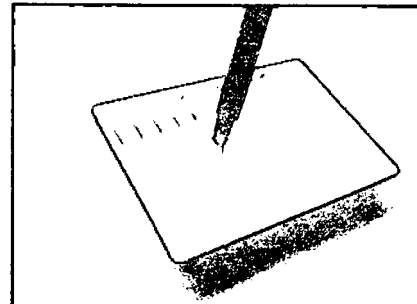


DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS

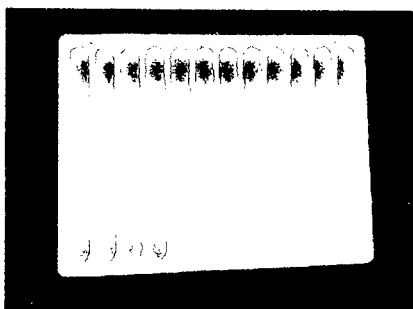
ANEXO 8: Procedimiento de hibridación reversa.



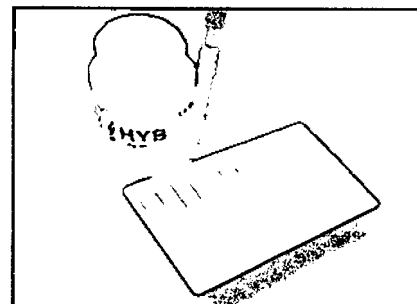
1. Dispensar 20µl de DEN



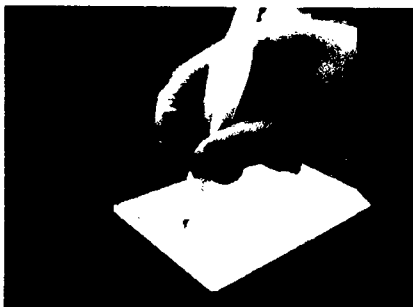
2. Agregar 20µl del producto de PCR



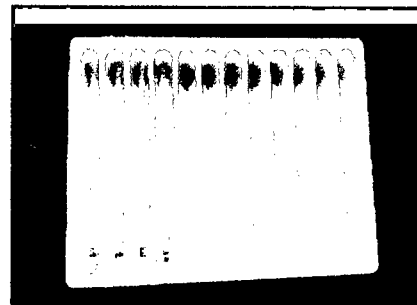
3. Mezclar e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente



4. Agregar 1ml de HYB precalentado y mezclar cuidadosamente



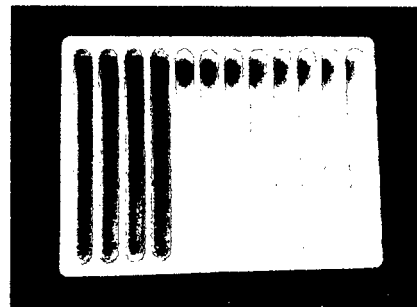
5. Colocar la tira de ADN



6. Incubar a 45°C por 30 minutos. Luego aspirar completamente el HYB



7. Agregar 1ml de STR



8. Incubar a 45°C durante 15 minutos. Luego eliminar completamente el STR

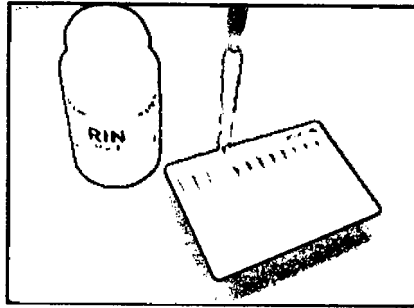


DR. L.F. DONAIRES

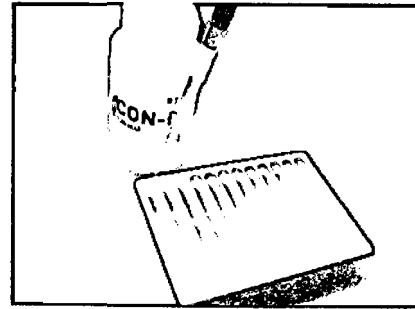


V. SUÁREZ

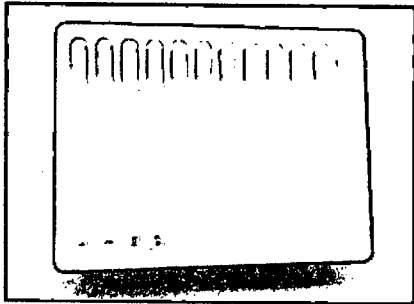
**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS**



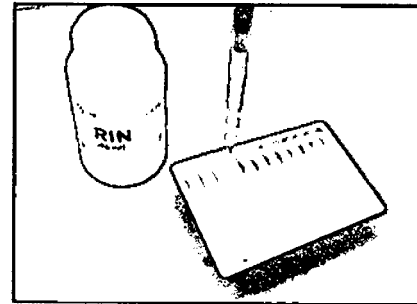
9. Agregar 1ml de RIN e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego eliminar completamente el RIN



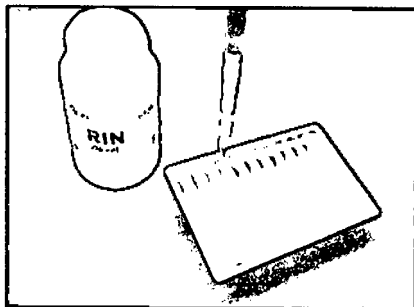
10. Agregar 1ml de conjugado diluido



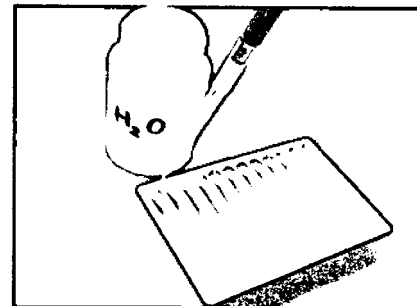
11. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego eliminar completamente el conjugado



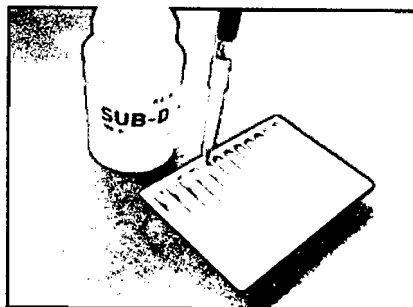
12. Agregar 1ml de RIN e incubar a temperatura ambiente por un minuto. Luego eliminar completamente el RIN



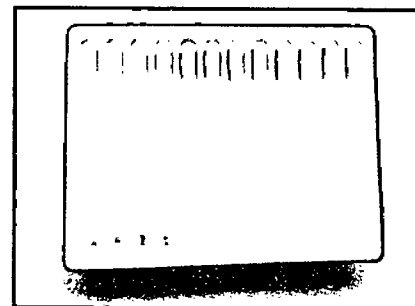
13. Agregar 1ml de RIN e incubar a temperatura ambiente por un minuto. Luego eliminar completamente el RIN



14. Agregar 1ml de agua e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Luego eliminar completamente el agua



15. Agregar 1ml de sustrato diluido



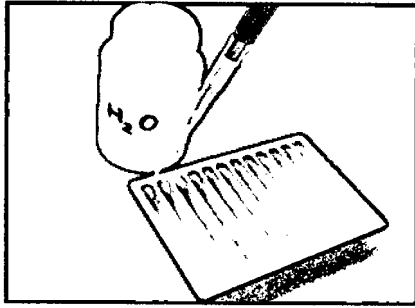
16. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego eliminar completamente el sustrato


 DR. L.F. DONAIRES

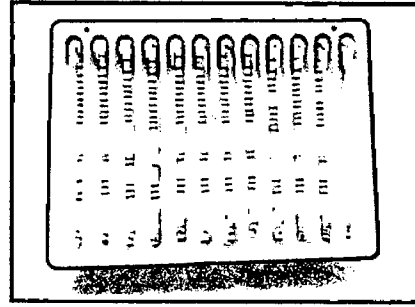

 LABORATORIO DE REFERENCIA NACIONAL
 MICOBACTERIAS
 UNIDAD DE BACTERIOLOGIA - DEE/CUSP


 V. SUÁREZ

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS



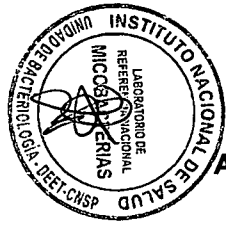
17. Realizar dos lavados con 1ml de agua para detener la reacción



18. Extraer la tira de ADN de la bandeja y dejar secar. Luego realizar la lectura

Fuente: Imágenes obtenidas en el LRNM del INS.



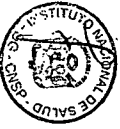


ANEXO 9: Estratificación de la resistencia para isoniacida y moxifloxacin en mutaciones asociadas con “resistencia de bajo nivel” o “resistencia de alto nivel”, y clasificación de la resistencia para amikacina.

Isoniacida

Secuencia objetivo	Presencia/ausencia de bandas	Mutación(es) examinada(s)	Tipo de mutación
<i>katG</i> WT	<i>katG</i> MUT1 o MUT2 presentes	Ser315Thr1 o Ser315Thr2	Mutación detectada, asociada con resistencia de alto nivel.
	<i>katG</i> WT, MUT1 y MUT2 ausentes	Mutación(es) en la región del codón 315	Mutación inferida, asociada con resistencia de alto nivel.
<i>inhA</i> WT1	<i>inhA</i> MUT1 presente	c-15t	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>inhA</i> MUT2 presente	a-16g	Mutación detectada, probablemente asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>inhA</i> WT1, MUT1 y MUT2 ausentes	Mutación(es) en la región -15	Mutación inferida, probablemente asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
<i>inhA</i> WT2	<i>inhA</i> MUT3A presente	t-8c	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>inhA</i> MUT3B presente	t-8a	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>inhA</i> WT2, MUT3A y MUT3B ausentes	Mutación(es) en la región -8	Mutación inferida, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.

DR. L.F. DONAIRES



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS



Moxifloxacin

DR. L.F. DONAIRE



V. SUAREZ

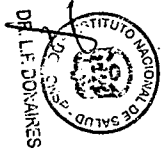


Secuencia objetivo	Presencia/ausencia de bandas	Mutación(es) examinada(s)	Tipo de mutación
<i>gyrA</i> WT1	<i>gyrA</i> WT1 ausente	Mutación(es) en los codones 85-89	Mutación inferida, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
<i>gyrA</i> WT2	<i>gyrA</i> MUT1 presente	Ala90Val	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>gyrA</i> MUT2 presente	Ser91Pro	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>gyrA</i> WT2, MUT1 y MUT2	Mutación(es) en los codones 89-93	Mutación inferida, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
<i>gyrA</i> WT3	<i>gyrA</i> MUT3A presente	Asp94Ala	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>gyrA</i> MUT3B presente	Asp94Asn o Asp94Tyr	Mutación detectada, asociada con resistencia de alto nivel.
	<i>gyrA</i> MUT3C presente	Asp94Gly	Mutación detectada, asociada con resistencia de alto nivel.
	<i>gyrA</i> MUT3D presente	Asp94His	Mutación detectada, asociada con resistencia de alto nivel.
	<i>gyrA</i> WT3, MUT3A, MUT3B, MUT3C y MUT3D ausentes	Mutación(es) en los codones 92-96	Mutación inferida, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
<i>gyrB</i> WT	<i>gyrB</i> MUT1 presente	Asn538Asp	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>gyrB</i> MUT2 presente	Glu540Val	Mutación detectada, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.
	<i>gyrB</i> WT, MUT1 y MUT2 ausentes	Mutación(es) en los codones 536-541	Mutación inferida, asociada con al menos resistencia de bajo nivel.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

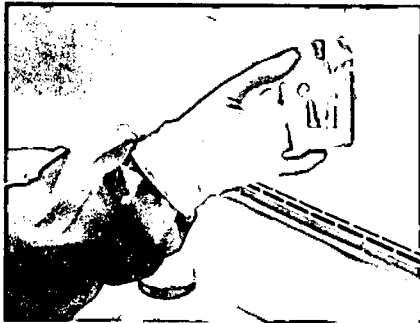
Amikacina



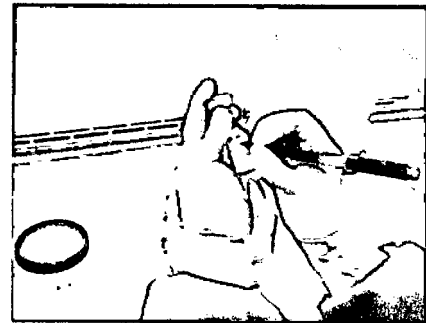
Secuencia objetivo	Presencia/ausencia de bandas	Mutación(es) examinada(s)	Tipo de mutación
<i>rrs</i> WT1	<i>rrs</i> MUT1 presente	a1401g	Resistencia detectada
	<i>rrs</i> WT1 y MUT1 ausentes	Mutación(es) en la región 1400	Resistencia inferida
<i>rrs</i> WT2	<i>rrs</i> MUT2 presente	g1484t	Resistencia detectada
	<i>rrs</i> WT2 y MUT2 ausentes	Mutación en la región 1484	Resistencia inferida
<i>eis</i> WT1	<i>eis</i> WT1 ausente	Mutación(es) en la región -37	Resistencia no detectada
<i>eis</i> WT2	<i>eis</i> MUT1 presente	c-14t	Resistencia detectada
	<i>eis</i> WT2 y MUT1 ausentes	Mutación(es) en la región -10 a -14	Resistencia no detectada
<i>eis</i> WT3	<i>eis</i> WT3 ausente	Mutación(es) en la región -2	Resistencia no detectada

ANEXO 10: Proceso del ensayo “Amplificación automatizada del ácido nucleico en tiempo real altamente sensible”: Inactivación y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

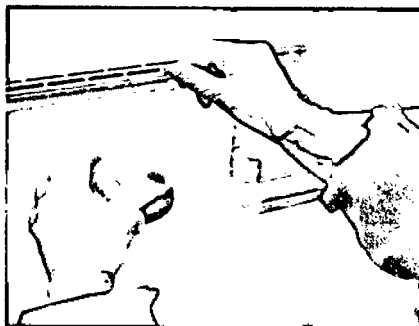
Se evalúa las muestras en orden para verificar los códigos de las fichas con las muestras y se procede a abrir con cuidado la tapa del frasco de muestra.



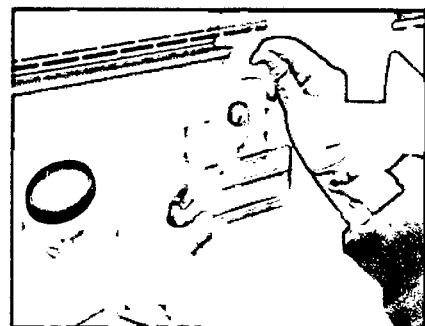
1. Evaluar la muestra macroscópicamente (cantidad y calidad) y verificar los códigos



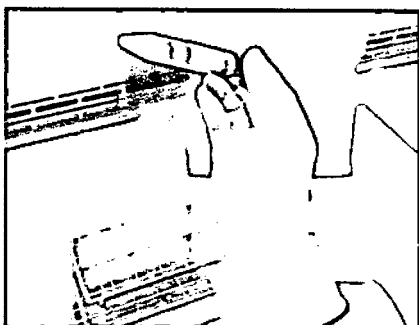
2. Rotular un tubo de centrifuga de 15ml con el código de la muestra



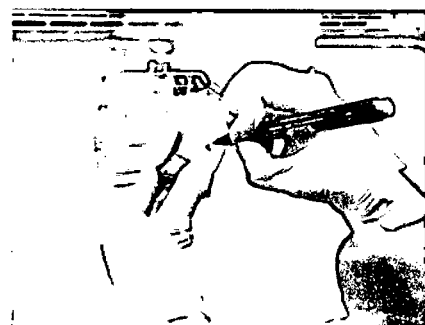
3. Agregar 1ml de muestra al tubo de 15ml



4. Agregar la solución SR en la proporción 2:1 (2 de SR y 1 de muestra)



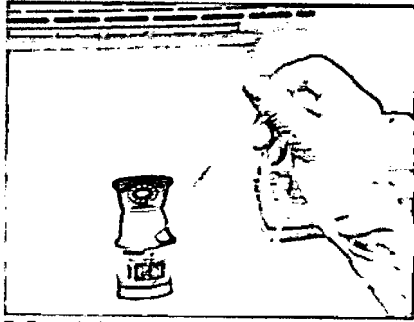
5. Agitar vigorosamente de 10 a 20 veces. Repetir la acción dos veces en el lapso de 15 minutos



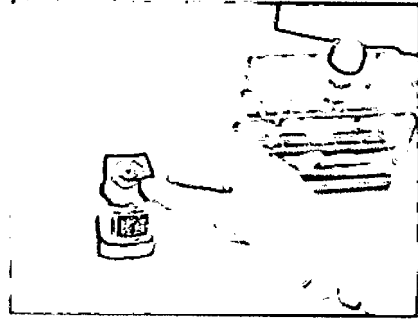
6. Rotular un cartucho de procesamiento con el código de la muestra



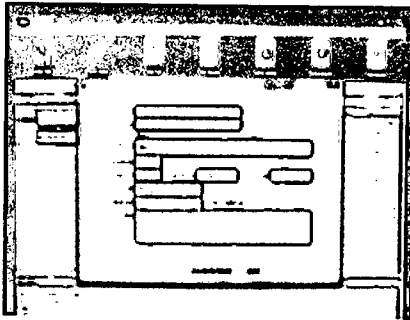
**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**



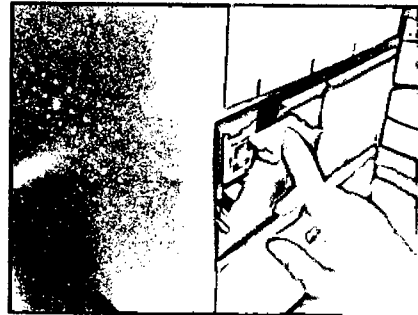
7. Pasado los 15 minutos, absorber la muestra digerida hasta donde indique la marca de la pipeta de transferencia contenida en el kit y transferir la muestra procesada hacia el interior del cartucho



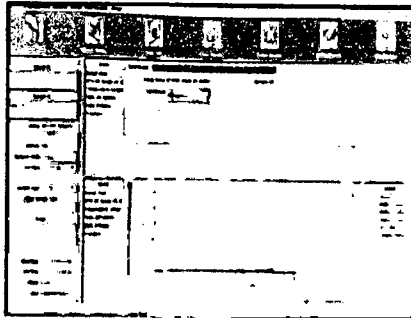
8. Asegurar la tapa del cartucho, desinfectarlo con lejía al 1% y llevarlo al equipo automatizado



9. Llenar los datos de la muestra, número de lote del cartucho, y seleccionar el módulo a usar en el programa de diagnóstico



10. Introducir el cartucho en el módulo y dar inicio al proceso de Q-PCR



11. Después de 1 hora y 45 minutos, verificar el resultado del ensayo mediante la gráfica de sondas


DR. L.F. DONAIRES


LABORATORIO DE
REFERENCIA NACIONAL
MICOBACTERIAS
UNIDAD DE BACTERIOLOGIA - DIFET/DIRSP


V. SUÁREZ

Fuente: Imágenes obtenidas en el LRNM del INS.

DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS

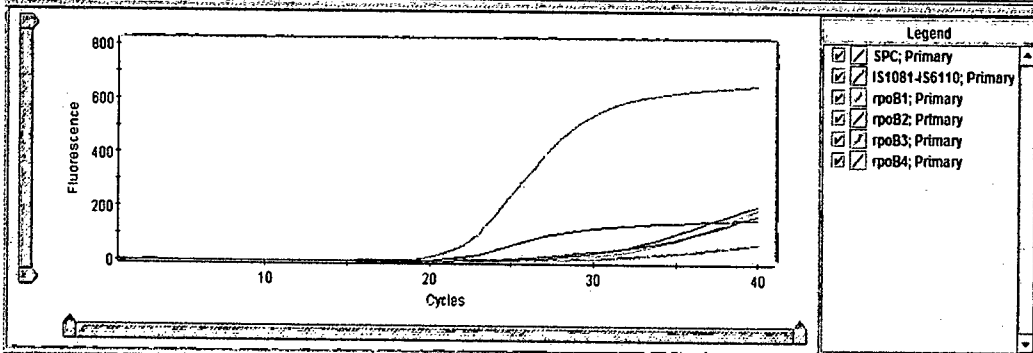
ANEXO 11: Resultados de la prueba molecular "Amplificación automatizada del ácido nucleico en tiempo real altamente sensible".

Test Result Analyte Result Detail Melt Peaks Errors History Support

Assay Name Xpert MTB-RIF Ultra Version 4

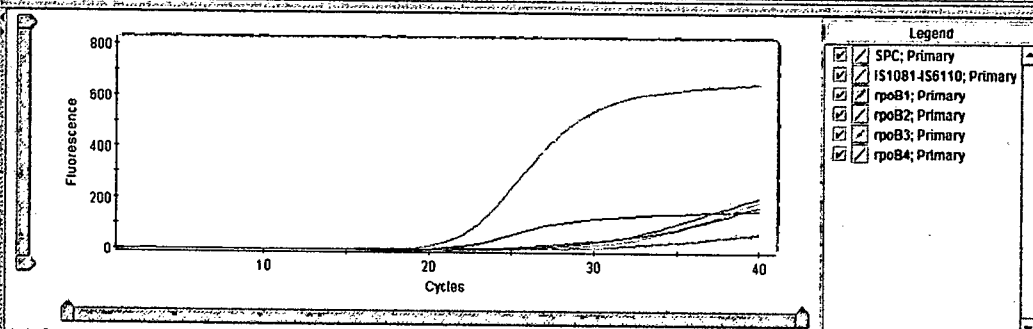
Test Result **MTB DETECTED VERY LOW**
RIF Resistance DETECTED

For in Vitro Diagnostic Use Only.



Select Graphs View Test

Analyte Name	Ct	EndPI	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	24.0	157	NA	PASS
IS1081-4S6110	21.8	655	NA	PASS
rpoB1	33.1	191	POS	PASS
rpoB2	31.0	204	POS	PASS
rpoB3	36.3	65	POS	PASS
rpoB4	30.1	170	POS	PASS

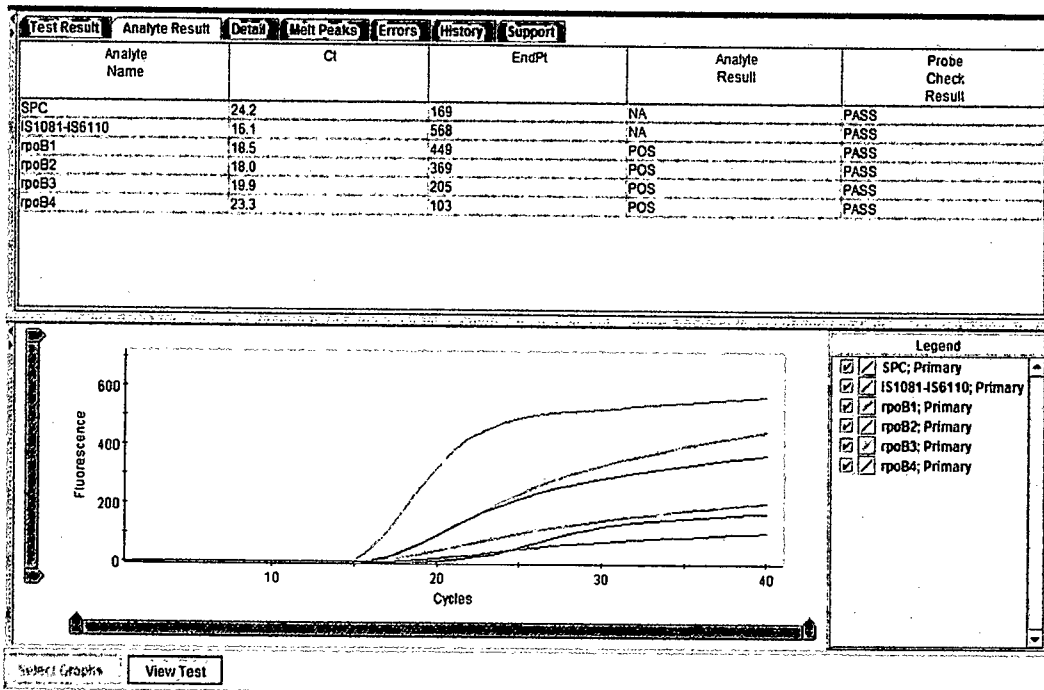
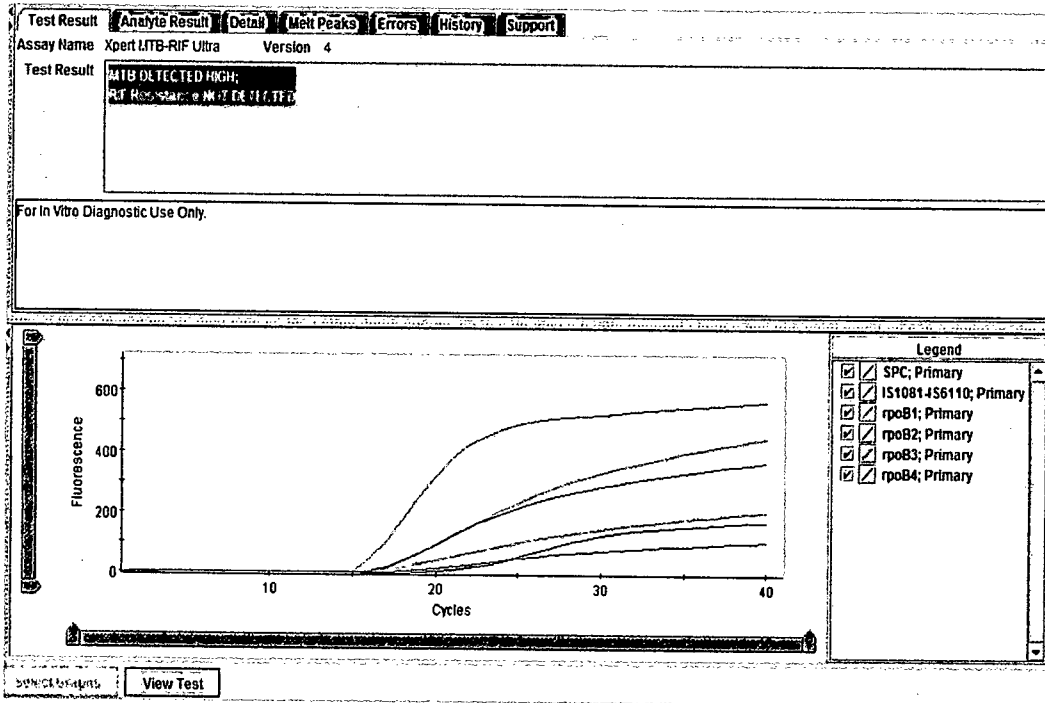


Select Graphs View Test

1. Resultado: MTB DETECTADO; resistencia a R: DETECTADA.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**

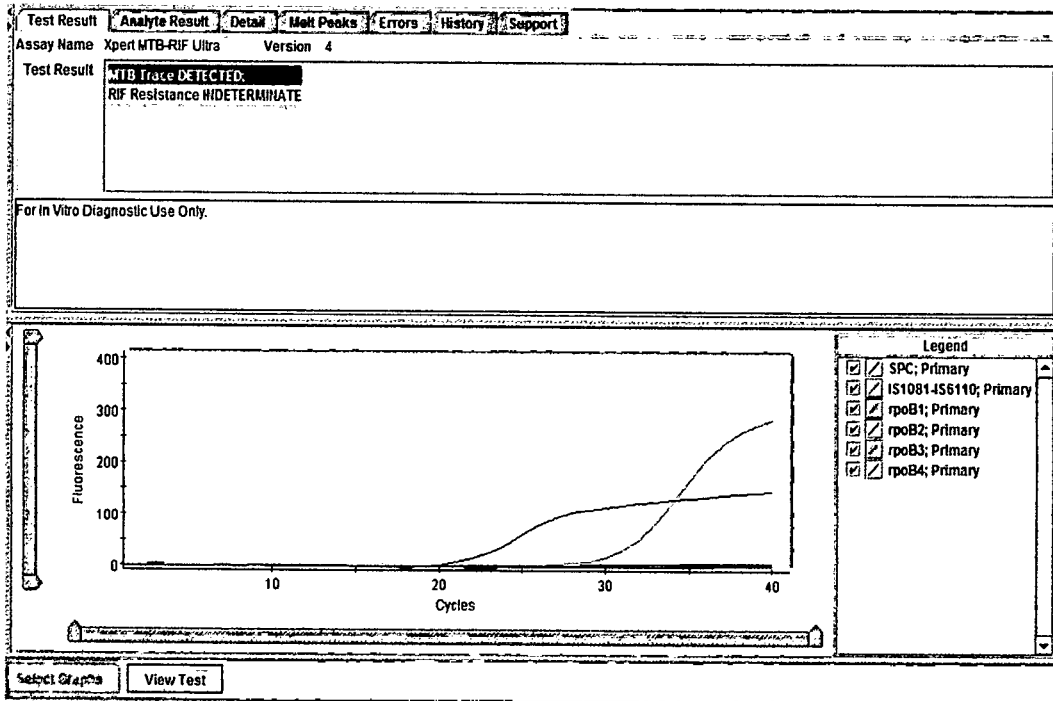



DR. L.F. DONAIRES

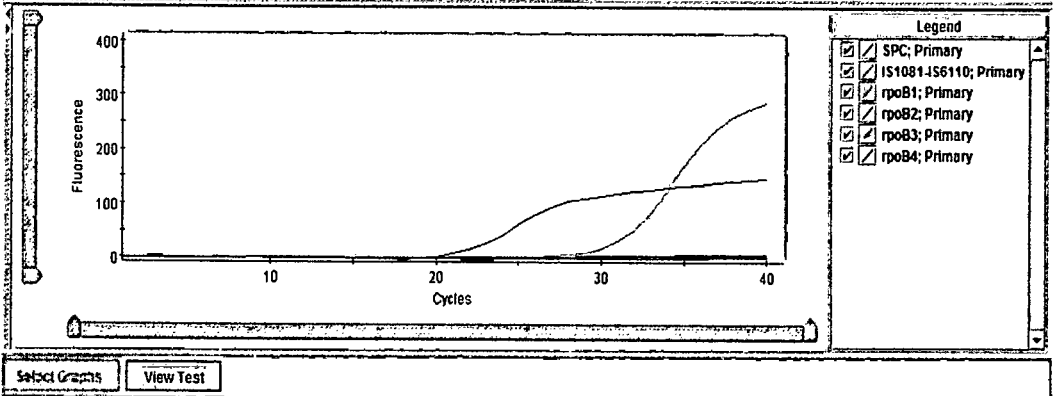
2. Resultado: MTB DETECTADO; resistencia a R: NO DETECTADA.



DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA TUBERCULOSIS



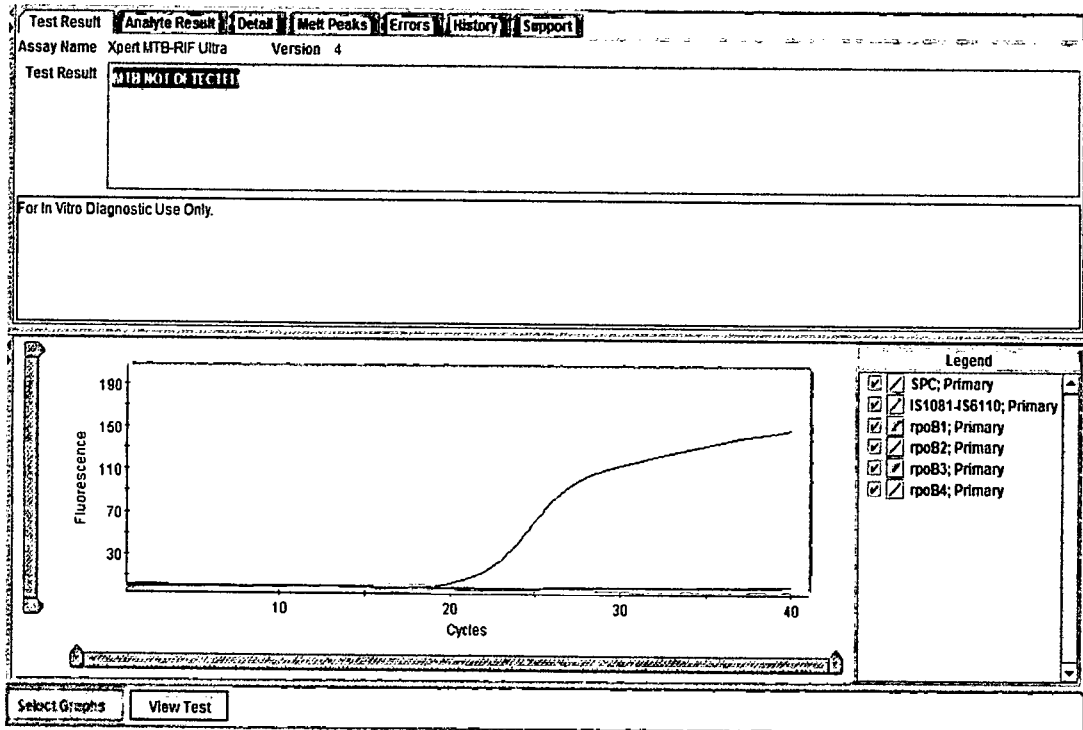
Analyte Name	CI	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	24.0	147	PASS	PASS
IS1081-IS6110	31.9	285	PASS	PASS
rpoB1	0.0	2	NEG	PASS
rpoB2	0.0	0	NEG	PASS
rpoB3	0.0	4	NEG	PASS
rpoB4	0.0	7	NEG	PASS



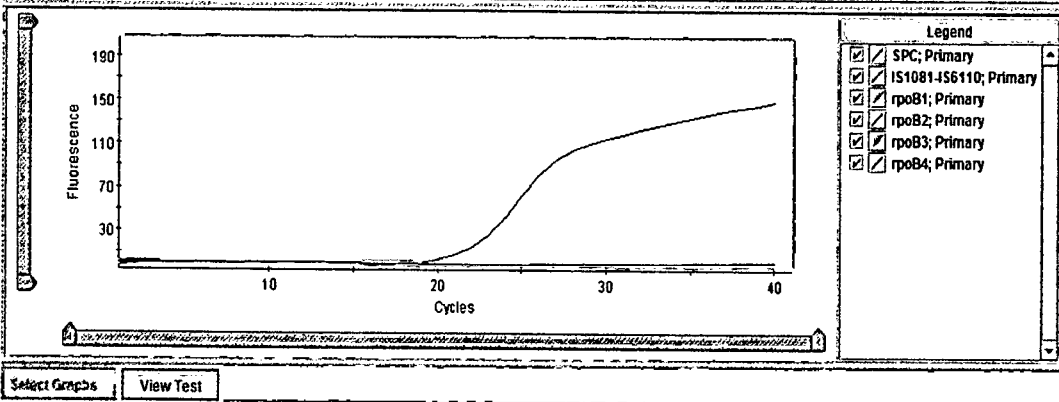
3. Resultado: MTB DETECTADO; resistencia a R: INDETERMINADA.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**



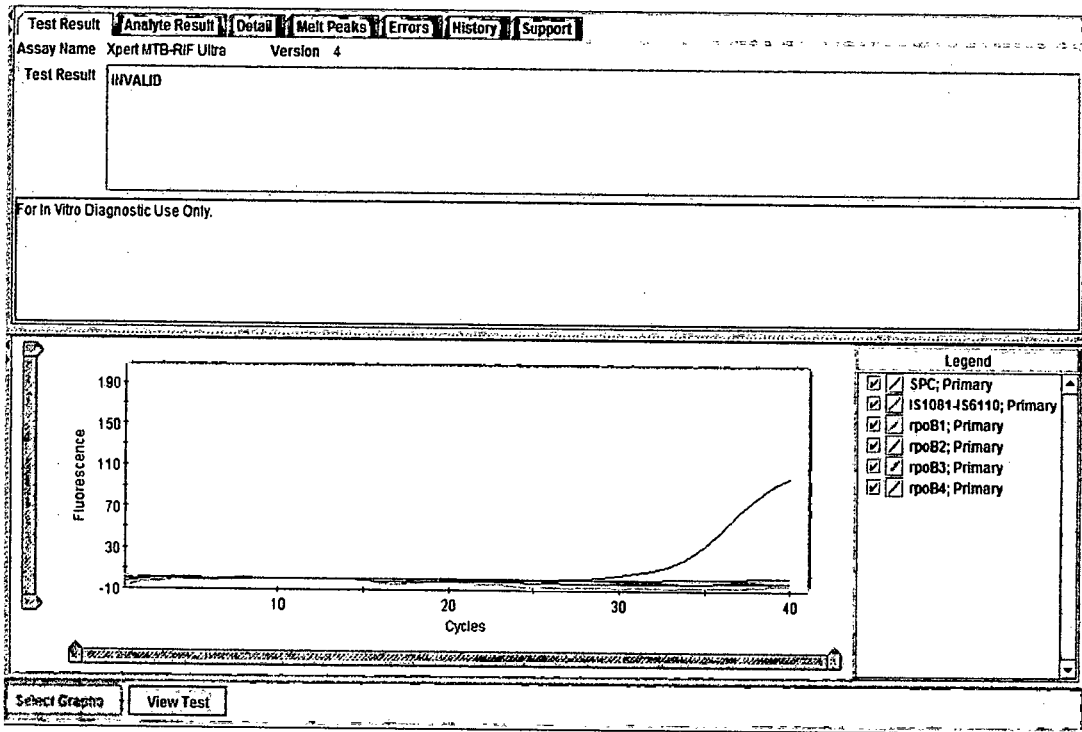
Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	23.9	149	PASS	PASS
IS1081-IS6110	0.0	4	FAIL	PASS
rpoB1	0.0	3	INVALID	PASS
rpoB2	0.0	1	INVALID	PASS
rpoB3	0.0	2	INVALID	PASS
rpoB4	0.0	1	INVALID	PASS



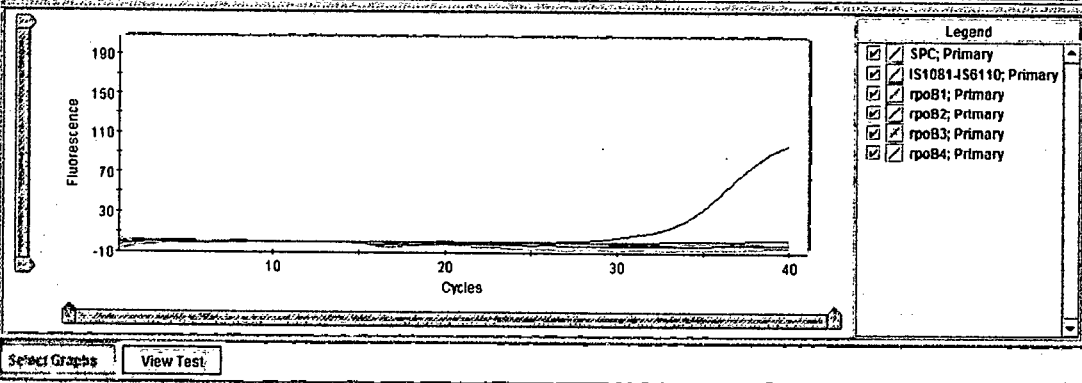
4. Resultado: MTB NO DETECTADO.



**DOCUMENTO TÉCNICO:
MANUAL DE PRUEBAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y DE SENSIBILIDAD DE LA
TUBERCULOSIS**



Analyte Name	CI	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	35.4	98	FAIL	PASS
IS1081-IS6110	0.0	0	FAIL	PASS
rpoB1	0.0	-5	INVALID	PASS
rpoB2	0.0	-2	INVALID	PASS
rpoB3	0.0	0	INVALID	PASS
rpoB4	0.0	2	INVALID	PASS



5. Resultado: NO VÁLIDO.

Fuente: Imágenes obtenidas en el LRNM del INS



J. Ace