Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Implementación de un laboratorio para el proceso de dos pruebas moleculares para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas humanas

TRABAJO PROFESIONAL

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en Zoología

AUTOR

Dominique Yohana MALDONADO SÁNCHEZ

ASESOR

Dr. Dan Erick VIVAS RUIZ

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Maldonado, D. (2023). *Implementación de un laboratorio para el proceso de dos pruebas moleculares para la detección del complejo Mycobacterium tuberculosis en muestras biológicas humanas*. [Trabajo Profesional de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Dominique Yohana Maldonado Sánchez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	44761074
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Dan Erick Vivas Ruiz
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	41951131
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4417-2026
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Enrique Walter Mamani Zapana
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	02414092
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Debora Elizabeth Alvarado Iparraguirre
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07576929
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.1. Salud Pública

Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento.
Ubicación geográfica de la investigación	Obligatorio. Indique el lugar o lugares y sus coordenadas en **grados decimales GD** donde ha sido realizada la investigación. La ubicación geográfica no está referida a su domicilio, en el caso que no precise un lugar donde se haya realizado la investigación coloque Universidad Nacional Mayor de San Marcos y sus coordenadas geográficas. Ejemplo: Edificio: UNILABS País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Jesús María Calle: Avenida Gregorio Escobedo 612 Latitud: -12.084800 Longitud: -77.053810
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Obligatorio. Ejemplo: Octubre 2020 – Diciembre 2020
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03 Otras temas de biología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.16

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA CON MENCIÓN EN ZOOLOGIA
TITULACIÓN EXTRAORDINARIA VIRTUAL (MODALIDAD: TRABAJO PROFESIONAL)

Siendo las 10:04 horas del 15 de diciembre de 2023, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue https://meet.google.com/whw-vxfm-qqe y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga con mención en Zoología** de **DOMINIQUE YOHANA MALDONADO SÁNCHEZ.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **Nº UNMSM-20230104715**, la titulando expuso su Trabajo Profesional: **IMPLEMENTACIÓN DE UN LABORATORIO PARA EL PROCESO DE DOS PRUEBAS MOLECULARES PARA LA DETECCIÓN DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis* EN MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **18**,calificativo: **Aprobado con mención honrosa.**

Habiéndose cumplido con las disposiciones del Reglamento, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y luego al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga con mención en Zoología** a **DOMINIQUE YOHANA MALDONADO SÁNCHEZ** y se eleve lo actuado al Rectorado de la Universidad para conferir el respectivo Título, conforme a ley.

Siendo las 11:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 15 de diciembre de 2023.

Dr. ENRIQUE WALTER MAMANI ZAPANA
(PRESIDENTE)

Dr. DAN ERICK VIVAS RUIZ
(TUTOR)

Mg. DEBORA ELIZABETH ALVARADO IPARRAGUIRRE
(MIEMBRO)

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo **Dr. DAN ERICK VIVAS RUIZ** en mi condición de asesor del Informe de Trabajo Profesional de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, de la Facultad de Ciencias Biológicas; cuyo título es **"Implementación de un laboratorio para el proceso de dos pruebas moleculares para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras biológicas humanas"** presentado por la Bachiller **DOMINIQUE YOHANA MALDONADO SÁNCHEZ** para optar al Título Profesional de **Bióloga** con mención en **Zoología**.

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 13% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.



Dr. **DAN ERICK VIVAS RUIZ**
DNI: 41951131

TABLA DE CONTENIDO

Carátula…. 1

Tabla de contenido 2

Introducción 3

Perfil de la Institución 5

Marco Teórico 5

Métodos y Acciones empleados en relación con la actividad profesional 17

Resultados 23

Conclusiones 41

Perspectivas 42

Referencias bibliográficas 43

Anexos 44

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por un agente conocido como Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que tiene múltiples formas clínicas. Debido a la alta incidencia de casos, la presencia de formas resistentes y su asociación con otras enfermedades, como la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la diabetes *mellitus*; la convierte en un reto para salud pública (MINSA 2023).

Precisamente, la alta incidencia de casos se ve reflejada en el laboratorio privado Unilabs, el cual recibe gran cantidad de órdenes médicas donde se solicita la detección molecular de este agente infeccioso en líquidos biológicos; siendo necesaria su tercerización a otros laboratorios, ya que no cuenta con esta prueba dentro de su portafolio. Es por ello que, con el fin de cubrir esta necesidad, se solicita al Laboratorio de Biología Molecular, la implementación de una prueba que detecte este patógeno. Por lo que, es necesario instalar un laboratorio que cumpla con los requerimientos necesarios de infraestructura y diseño, equipamiento, y equipos de protección personal.

Uno de los mayores riesgos de infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* es la generación de aerosoles (OMS 2019). Por ello, es necesario abordar todas las formas que mitiguen la generación y propagación de estos aerosoles dentro del laboratorio. Así pues, implementando un laboratorio con las condiciones idóneas de bioseguridad, se asegurará un satisfactorio desempeño de la prueba molecular, que abarcará todo el flujo de trabajo, desde la recepción de las muestras biológicas, procesamiento y almacenamiento, y finalmente la eliminación del material biocontaminado. En consecuencia, se garantizará obtener un resultado óptimo de ayuda al diagnóstico del paciente.

La implementación de una nueva prueba en un laboratorio requiere compararla con un método de referencia – *gold standard* –. Para el caso del complejo *Mycobacterium tuberculosis,* el método de referencia es el cultivo sólido Löwenstein-Jensen (LJ).

De este modo, el presente informe de Trabajo Profesional detallará la instalación de un laboratorio apropiado para la implementación de dos pruebas moleculares en líquidos biológicos y tejidos sólidos: (i) detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante qPCR, y (ii) detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y resistencia a fármaco rifampicina mediante Xpert MTB-Rif Ultra.

II. PERFIL DE LA INSTITUCIÓN

Unilabs es una compañía internacional de profesionales del área médica (médicos, biólogos, tecnólogos médicos y técnicos de laboratorio) y miembros de equipos de apoyo al diagnóstico. Con sedes en doce países alrededor del mundo; en Perú, Unilabs está conformada por tres unidades de negocio: Laboratorio clínico, Anatomía Patológica e Imágenes médicas.

El laboratorio de Biología Molecular y Genética pertenece a la unidad Unilabs Pathology (Razón social: Unilabs Pathology Diagnostics Services S.A.C., RUC 20161950069, con dirección en Avenida Gregorio Escobedo 612, distrito Jesús María, Lima - Perú) a la actualidad cuenta con pruebas dirigidas a:

- Detección, tipificación y predicción del cáncer (tumores sólidos y líquidos).
- Detección de agentes infecciosos (virus del Papiloma Humano, virus SARS-Cov2) por PCR en tiempo real.
- Cariotipo humano en sangre periférica y médula ósea.

III. MARCO TEÓRICO

III.1.Antecedentes

- ✓ Portafolio de pruebas relacionadas a tuberculosis en Unilabs

Anteriormente, el laboratorio de Biología Molecular para la detección de agentes infecciosos, estaba a cargo de la empresa Blufstein Laboratorio Clínico (RUC 20299942423, sede en San Isidro); ahí se realizaba la detección de *Mycobacterium tuberculosis* mediante la técnica de PCR a punto final.

En el año 2017, Unilabs adquiere la empresa Blufstein (dedicada al Laboratorio clínico), y también adquiere la empresa Arias Stella (dedicada a la Anatomía Patológica con sede en Jesús María). Ambas empresas poseían un laboratorio de Biología Molecular. Por su parte, Blufstein realizaba pruebas relacionadas a la detección de agentes infecciosos; mientras que, en Arias Stella, se desarrollaba pruebas moleculares relacionadas al cáncer (oncohematológicas y

de tumores sólidos). Es así que, en el año 2019, se unifica un solo laboratorio de Biología Molecular que corresponderá a la Unidad Unilabs Pathology. Sin embargo, no fue posible incorporar la prueba "Detección de *Mycobacterium tuberculosis*" al nuevo portafolio de pruebas moleculares, debido a que no se tenía la infraestructura adecuada en el nuevo laboratorio.

Es importante señalar que, Unilabs cuenta también con otras pruebas relacionadas al estudio de la tuberculosis como:

- Laboratorio de Inmunología: Quantiferon TB-Gold
- Laboratorio de Micobacteriología: BK directo, BK seriado, cultivo en medio sólido – Löwenstein-Jensen, cultivo en medio líquido – MGIT,y DST – Test de sensibilidad a drogas.

✓ Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR a punto final.

Se realizaba una PCR *in-house* que detectaba la secuencia de inserción "IS6110", que es específico para los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El tamaño molecular de este fragmento era de 384 pares de bases (bp), y se evidenciaba en un gel de agarosa. La figura 1 muestra una fotografía de un gel con resultado positivo a *Mycobacterium tuberculosis.*

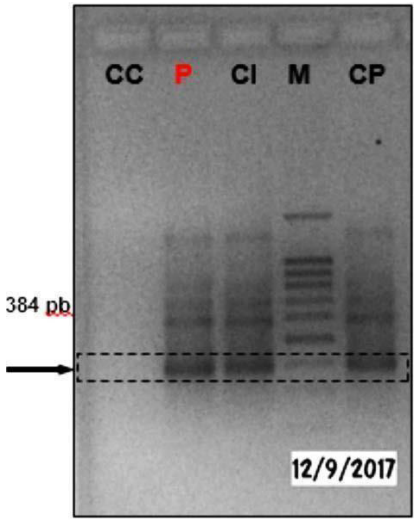


Fig. 1. Resultado positivo en un gel de agarosa. CC: control de corrida (control negativo), P: muestra del paciente, CI: control de inhibición, M: marcador de peso molecular de 100 pB, CP: control positivo.

III.2. ¿Qué es la tuberculosis?

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, contagiosa, prevenible y curable, que afecta mayormente a la población económicamente activa. Considerada como un reto de salud pública, debido a la alta incidencia de casos, la presencia de formas resistentes, la asociación con otras enfermedades como la infección del virus de la inmunodeficiencia humana y las diabetes *mellitus*, así como su presencia en todos los estratos sociales. Es una enfermedad que produce un impacto social y económico, tanto en el afectado como en su núcleo familiar y comunidad. Está asociada a los determinantes sociales de la salud, tales como pobreza, malnutrición, desempleo, carencia de servicios básicos, exclusión social, bajo nivel educativo, entre otros, que favorecen su transmisión y dificultan la adherencia al tratamiento que la combate (MINSA 2023).

Es un patógeno notablemente exitoso que infecta principalmente los pulmones, desarrollando la clásica patología “tuberculosis pulmonar”. Adicionalmente, otros órganos y tejidos pueden verse afectados, incluidos ganglios linfáticos, cerebro, riñones y columna vertebral, en un trastorno

llamado tuberculosis extrapulmonar; estas patología se conocen como "tuberculosis extrapulmonar" (Rahlwes, Dias et al. 2023).

III.3. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* constituye un grupo genéticamente homogéneo importante. Los árboles filogenéticos del género *Mycobacterium* que emplean secuencias de genes 16S rRNA muestran que todas las especies de *Mycobacterium* están cercanamente relacionadas entre ellas mismas, y se alejan de los miembros de otros géneros (Ali Akbar Velayati 2016). Sin embargo, difieren ampliamente respecto su tropismo, fenotipos y patogenicidad. El complejo incluye a *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium dassie*, *y Mycobacterium oryx*. De estas especies, *M. tuberculosis* es el miembro más conocido (Ali Akbar Velayati 2016).

Muchos estudios han establecido la utilidad de las secuencias de inserción *IS6110* y *IS1081*, para la identificación y tipificación de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Ambas secuencias son específicas para los miembros del complejo, sin embargo, el número de copias puede ser variable entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Retamal M, Martinez T et al. 2003).

III.4. Incidencia de casos en Perú y en el mundo

De acuerdo al último reporte sobre tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud, se estima que, en el 2021, 10.6 millones de personas desarrollaron tuberculosis (WHO 2022); y en el Perú, 44000 personas; teniendo una mortalidad de 4000 peruanos (OMS 2022).

Entre el 2017 al 2021, la tasa de mortalidad por TB, con y sin VIH, varió de 6.28 a 7.37 muertes por 100,000 habitantes (MINSA 2023), (Macalupu Agüero and Villegas Kergel 2022).

III.5. Tipos de pruebas para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Existen diferentes exámenes para diagnosticar la tuberculosis. El examen más utilizado es la baciloscopía (BK). Sin embargo, la baciloscopía sólo detecta bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR), no diferencia *M. tuberculosis de otros BAAR*, incluyendo a las micobacterias no tuberculosas. Si bien es una prueba rápida, su baja especificidad para el diagnóstico de tuberculosis hace que se requiera exámenes auxiliares como los cultivos.

También existen otros exámenes que pueden ayudar a diagnosticar un caso de tuberculosis:

- ✓ Exámenes de laboratorio
  - Bacteriológicos: baciloscopía, cultivo y prueba de sensibilidad
  - Moleculares: qPCR, ensayos con sondas en línea (LPA)
- ✓ Exámenes de imágenes: radiografía de tórax

III.6. Descontaminación de muestras

Dentro del análisis de las muestras biológicas, éstas pueden ser estériles o contaminados. Las muestras biológicas consideradas estériles son aquellos que se localizan en un compartimento biológico estéril, entre ellos se encuentran: líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido sinovial, líquido pleural, sangre y médula ósea colectada al vacío, biopsias (dependiendo de la zona en estudio). Entre las muestras consideradas como contaminadas, se encuentran: esputo, orina, abscesos, o lesiones, hisopado de secreciones (nasal, vaginal, laríngeo, herida), aspirado y post aspirado bronquial, lavados (gástrico, bronquial), fístula, líquido seminal.

Para un correcto desempeño de un examen diagnóstico de laboratorio para tuberculosis, es necesario realizar un procedimiento conocido como “descontaminación”. Este procedimiento tiene como objetivo la eliminación de bacterias diferentes a las micobacterias, además de la licuación de moco y de residuos orgánicos de la muestra. Existen varias técnicas disponibles, pero ninguna de ellas puede destruir selectivamente sólo la flora contaminante y lograr la licuefacción completa del espécimen. Por ello, un protocolo adecuado descontaminación buscará destruir la mayor cantidad de bacterias contaminantes como sea posible, dañando el menos número de micobacterias.

El protocolo estándar más usado es el *NALC-NaOH* “N-Acetil L-Cisteína e Hidróxido de Sodio” (Kubica, Dye et al. 1963).

III.7. Características de un laboratorio de tuberculosis

Para poder delimitar las instalaciones de un laboratorio de tuberculosis, es necesario saber en qué clasificación se ubica.

Según la tercera edición del manual “Bioseguridad en laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos” (MINSA 2005), se indica que aquellas instalaciones (clínicas, de diagnóstico, enseñanza, investigación o producción) donde se lleve a cabo trabajos con agentes biológicos del grupo 3 (donde se encuentra *Mycobacterium tuberculosis*, ver Anexo 1), que pueden producir una enfermedad grave o potencialmente letal como resultado de la exposición por vía de inhalación; debe aplicarse el nivel de bioseguridad 3 (NSB - 3).

Sin embargo, ha habido una evolución en la elaboración de directrices de bioseguridad en la última década, que relacionan el riesgo con la actividad. Anteriormente, se asignaba un microorganismo a un grupo de riesgo sobre la base de la virulencia, la transmisibilidad y la disponibilidad de tratamientos. El nivel de contención para un grupo de riesgo no tenía en cuenta los procedimientos reales que se realizaban ni sus riesgos inherentes (OMS 2019). Así, en el “Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis” de la OMS (2012), se incorporó un enfoque de evaluación de riesgos que tenía en cuenta los procedimientos que se realizaban.

Un diseño de laboratorio seguro y eficiente complementa la infraestructura al separar las actividades de riesgo bajo (“limpias”) de las de riesgo alto (“sucias”), y optimizar el movimiento dentro del laboratorio.

Las instalaciones de laboratorio de tuberculosis pueden clasificarse en tres grandes niveles de riesgo de procedimiento, según las actividades que se realicen y los riesgos que lleven asociados: bajo riesgo de tuberculosis, riesgo moderado de tuberculosis y alto riesgo de tuberculosis

(ver Fig. 2) (OMS 2013). De acuerdo a esta clasificación, el laboratorio donde se realizará las pruebas moleculares se ubica en “riesgo moderado de tuberculosis”, y deberá seguir las características específicas y medida de bioseguridad mínimas indispensables. Así, los requerimientos mínimos para esta categoría que se exige en el “Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis de la OMS” son los siguientes:

i. Cabina de bioseguridad de clase II tipo A2. Esta cabina será la barrera primaria y protegerá tanto al personal como los medios que se está inoculando (protección del producto).
ii. Ventilación: esta será la barrera secundaria, se logra manteniendo un flujo unidireccional hacia el laboratorio y asegurando un mínimo de 6 a 12 intercambios de aire por hora.
iii. Equipo de protección personal: uso constante de material descartable (mandil, guantes y botas cubrecalzado), mascarilla N95 o similar. El uso de otros equipos dependerá de la carga de trabajo y la prevalencia de cepas farmacorresistentes.
iv. Diseño de laboratorio: debe estar separado de zonas abiertas al tránsito. También debe disponer de un lavadero de manos ubicado cerca a la salida del laboratorio.
v. Descontaminación y eliminación de desechos: los desechos se transportarán en bolsas o recipientes de plástico cerrados siguiendo la normativa local apropiada.
vi. Reducción al mínimo de la generación de aerosoles: para el caso de centrífugas, deberán llevar cubetas de seguridad o rotores de contención. El material infeccioso puede ser centrifugado en el laboratorio abierto siempre que se utilicen recipientes de seguridad cerrados y que las cubetas sean cargadas y descargadas dentro de una CSB.

Nivel de riesgo del laboratorio de tuberculosis[a]	Actividades del laboratorio	Evaluación del riesgo
Bajo riesgo	Baciloscopia directa del esputo; preparación de muestras para utilizarlas en un cartucho de prueba automatizada de amplificación de ácidos nucleicos (como el ensayo Xpert MTB/RIF)	Bajo riesgo de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; baja concentración de partículas infecciosas
Riesgo moderado	Tratamiento y concentración de muestras para la inoculación en medios de cultivo primarios; antibiograma directo (por ejemplo, ensayos de sonda en línea en esputo tratado)	Riesgo moderado de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; baja concentración de partículas infecciosas
Alto riesgo (laboratorio de contención de tuberculosis)	Manipulación de cultivos para la identificación; antibiogramas o ensayos de sonda en línea en aislados cultivados	Alto riesgo de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; alta concentración de partículas infecciosas

Fig. 2. Niveles de riesgo, actividades de laboratorio y evaluación de riesgos en los laboratorios de tuberculosis. (OMS 2013)

III.8. Materiales para el desarrollo de las pruebas:

Se requiere los siguientes equipos y reactivos:

- ✓ Equipos:
  - Centrífuga refrigerada de tubos de 50 mL
  - Centrífuga refrigerada de microtubos de 2 mL
  - Termobloque seco con agitador
  - Agitador o vórtex de mesa
  - Micropipetas
  - Cuantificador de ADN
  - Termociclador en tiempo real
  - Refrigeradores
  - Congeladores
  - Autoclave

- ✓ Reactivos
  - Buffers para descontaminación
  - Kit de extracción de ADN
  - Kit de cuantificación de ADN
  - Kit Xpert MTB-Rif Ultra

- Kit de PCR para detección de complejo *Mycobacterium tuberculosis*

✓ Materiales consumibles

- Guantes de nitrilo
- Papel toalla
- Mandil descartable con abertura hacia atrás y puños
- Mameluco descartable
- Mascarilla N95 o respirador con filtro #2097
- Gorro descartable
- Racks para tubos (tamaños variables)
- Punteras con filtros (varios volúmenes)
- Pipeta Pasteur descartable de 1 mL y 3 mL
- Bisturí #25
- Placas Petri con división descartables
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL
- Microtubos taparrosca de 2 mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Parafilm
- Marcadores indelebles
- Suero fisiológico
- Hipoclorito de sodio al 3%
- Etanol 70%
- Pisetas de plástico
- Tachos para material biocontaminado de 8 L
- Tachos de piso con pedal, para material biocontaminado
- Bolsas autoclavables para desechos biocontaminados
- Cinta de autoclave
- Tubos PCR 0.2 mL

III.9. Comparación entre nuevas pruebas y el método de referencia cultivo sólido *Löwenstein-Jensen*

El medio de cultivo Löwenstein-Jensen sigue siendo el método de referencia para la valoración de los nuevos sistemas comerciales y se utiliza rutinariamente para el aislamiento de micobacterias de importancia clínica (Sepúlveda, García-Martos et al. 2001, Vega, Moreno et al. 2005). Así, para efectos de este trabajo, se deberá realizar un análisis comparativo que mida la concordancia entre un método ya conocido y un nuevo método por implementar. El análisis deberá realizarse entre las pruebas:

a. Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*: Xpert MTB-Rif Ultra y cultivo sólido Löwenstein-Jensen
b. Sensibilidad a fármaco Rifampicina: Xpert MTB-Rif Ultra y cultivo sólido Löwenstein-Jensen
c. Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*: qPCR y cultivo sólido Löwenstein-Jensen

III.10. Buenas prácticas de laboratorio

Es necesario realizar buenas prácticas de laboratorio antes, durante y después del proceso de las muestras biológicas.

El mayor riesgo de infección por tuberculosis en el laboratorio está asociado con la inhalación de aerosoles generados por los procesos de laboratorio. Minimizar su producción es el medio más eficaz para mantenerse a salvo (OMS 2019). Por ello, es necesario considerar prácticas de trabajo seguras que aborden:

- la prevención de actividades generadoras de aerosoles como agitación vorticial, centrifugado, mezclado, pipeteo.
- manipulación de muestras con carga bacilar: Volúmenes muy pequeños de muestra pueden contener un gran número de bacilos ácidorresistentes.

- Contaminación cruzada: entre muestras, entre muestras y reactivos, entre guantes contaminados y pipetas, tubos u otro equipo en uso
- Seguimiento de muestras: Proceso de laboratorio utilizado para garantizar que los resultados correctos corresponden al paciente correcto.

Igualmente, se debe seguir las consideraciones del Ministerio de Salud detalladas en los siguientes documentos:

- "Manual de Bioseguridad Manual de procedimientos - Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos Biomédicos y Clínicos". Serie de Normas Técnicas N° 18
- "Norma Técnica de Salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias Infecciosas" NTS Nº 153-MINSA/2019/INS
- Norma Técnica de Salud para el uso de los Equipos de Protección Personal por los Trabajadores de las Instituciones Prestadora de Servicios de Salud. NTS N° 161 – MINSA/2020 DGAIN

III.11. Sistema de Gestión de Calidad

Las operaciones de la Unidad de Anatomía Patológica de Unilabs, se encuentran certificadas con ISO 9001: 2015 (Certificación internacional de gestión de calidad).

III.12. Examen médico ocupacional

Se debe contar con un programa de salud ocupacional que promueva un lugar de trabajo seguro y saludable. El Área de Salud Ocupacional realiza evaluaciones anuales al personal, etas incluyen: análisis de sangre, orina, heces y esputo; así como radiografía de tórax, y chequeos de especialidades médicas como: oftalmología, psicología, evaluación musculoesquelética, dermatología, entre otras.

III.13. Xpert MTB-Rif Ultra

Prueba cerrada y automatizada, producida por la marca Cepheid, recomendada por la OMS, permite detectar en simultáneo a miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y la resistencia al fármaco Rifampicina. Tiene como diana el gen rpoB y las secuencias de inserción *IS6110* y *IS1081*. Es altamente sensible siendo su límite de detección 16 ufc/mL. El análisis de resistencia se da por curvas de fusión. Es un ensayo rápido, ya que se obtiene resultados en menos de 80 minutos (Cepheid 2017, Contrera, Amaya et al. 2021).

III.14. qPCR

Técnica de PCR (Reacción en cadena de polimerasa) en tiempo real que combina la amplificación y detección en un solo paso.

III.15. Competencias adquiridas

Las competencias académicas adquiridas durante el pre-grado, permitieron poder realizar estas actividades de manera responsable. Así pues, en esta experiencia laboral destacaron los siguientes cursos atendidos: Biología Celular, Bioquímica general, Fisicoquímica, Genética General, Biología Molecular, Microbiología General, Sistemática General y Fundamentos de Inmunología.

IV. MÉTODOS Y ACCIONES EMPLEADOS EN RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD PROFESIONAL

Se realizó un flujograma de trabajo (Fig. 3) para el mejor entendimiento de las actividades a realizar. Consta de 2 pasos fundamentales:

I. Implementar el laboratorio donde se procesarán las pruebas
II. Procesamiento de muestras que incluye desde la recepción de muestras, proceso de muestras, análisis de resultados y eliminación de residuos biocontaminados.

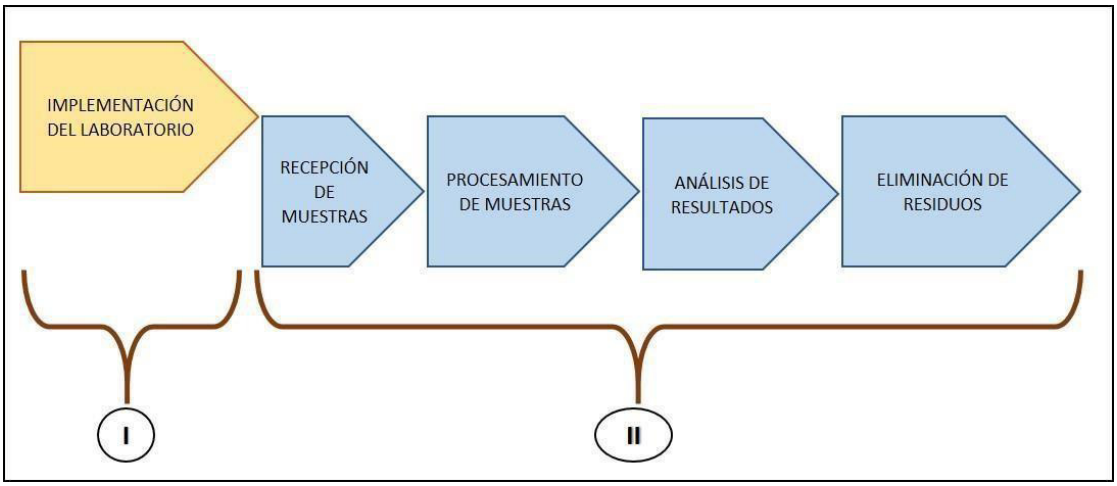


Fig. 3. Flujograma de trabajo de las actividades a realizar

IV.1. La implementación del laboratorio requerirá realizar las siguientes actividades:

1. Se solicitará disponer de un área dentro del edificio, con un mínimo de dos ambientes contiguos, que se encuentren aislados del tránsito del personal administrativo y de laboratorio.
2. Se diseñará la distribución siguiendo las indicaciones de los manuales detallados anteriormente.
3. Se solicitará los materiales y equipos necesarios para cada área de trabajo
4. Los requerimientos de infraestructura como instalación de sistema de ventilación mecánica y fluorescentes de luz UV en los techos (con el fin de potenciar la limpieza y desinfección de los

ambientes después del procesamiento de muestras), serán coordinados con el área de Infraestructura y Servicios Generales de Unilabs

5. Se deberá seguir los lineamientos del Sistema de Gestión de Calidad ISO 9001:2015
6. Se establecerá un horario para la eliminación de desechos biocontaminados

IV.2. Procesamiento del panel de muestras solicitadas mediante las dos pruebas a implementar

1. Se solicitó al Laboratorio de Micobacteriología de Unilabs, la preparación de un panel de trece muestras de líquidos biológicos (pulmonares y extrapulmonares). Este laboratorio se encargó de elegir muestras biológicas con resultado negativo, a las cuales a algunas se les inoculó una cepa positiva al complejo *Mycobacterium tuberculosis*; y a otras, no. Asímismo, estas cepas podrían ser sensibles o no al fármaco Rifampicina. Posterior a ello, se encargaron de separar dos alícuotas de muestra: (i) la primera alícuota se destina para el sembrado del cultivo sólido Löwenstein-Jensen (proceso realizado en su laboratorio). y, (ii) la segunda alícuota se destina para el proceso de pruebas moleculares. Los resultados del cultivo fueron desconocidos para el Laboratorio de Biología Molecular, y se entregaron hasta seis semanas después de la siembra. Las trece alícuotas de muestras fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular, siguiendo la cadena de biocustodia. Fueron recepcionadas y almacenadas en refrigeración de 2-8°C. El panel de muestras enviado se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Panel de muestras enviado por el Laboratorio de Micobacteriología

Número	Tipo de muestra
1	Líquido pleural
2	Liquido sinovial
3	Esputo
4	Tejido pulmonar
5	Aspirado bronquial
6	Post aspirado bronquial
7	Biopsia de mama
8	Lavado Bronquial
9	Secreción mamaria
10	LCR
11	Cepa
12	Cepa
13	Esputo DMS

2. Para la prueba “Xpert MTB-Rif Ultra”, se procesó las 13 muestras de acuerdo a indicaciones del fabricante. Paralelamente, se elaboró un instructivo de uso rápido (ver Fig. 4). Cabe resaltar que todas las figuras relacionadas a los procedimientos son de elaboración propia.

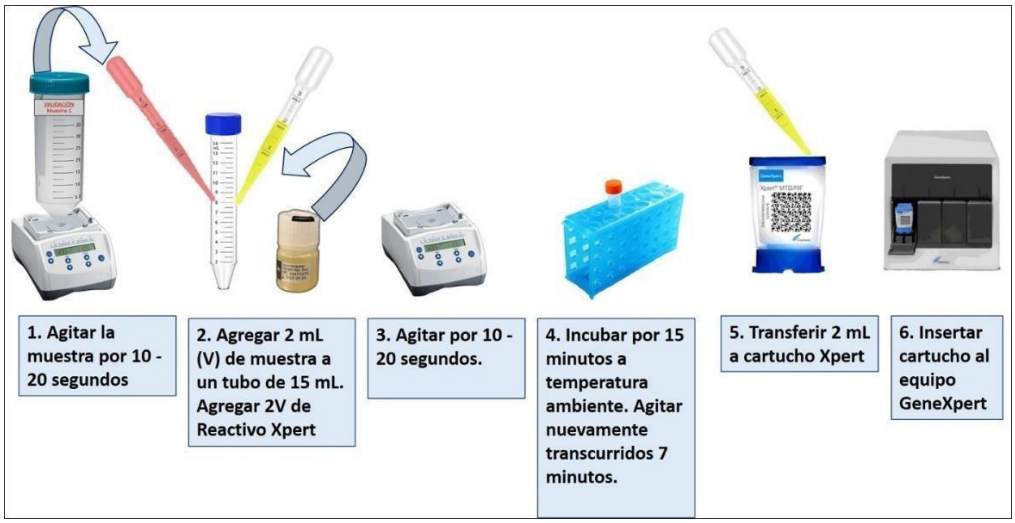


Fig. 4. Instructivo de uso rápido para procedimiento para prueba Xpert MTB-Rif. Fuente: Elaboración propia

3. Para la prueba “Detección de *Mycobacterium tuberculosis* por qPCR”, se procesaron 11 muestras del panel enviado. La muestra 11 (Cepa) y muestra 12 (Cepa), tuvieron volúmenes insuficientes y no fue posible procesarlas.

   La metodología para el proceso de muestras, se dividió en cuatro pasos:

   1. Descontaminación de muestras,usando protocolo NALC-OH (Kubica, Dye et al. 1963) (Fig. 5 y 6).



Fig. 5. Descontaminación de muestras (parte 1)



Fig. 6. Descontaminación de muestras (parte 2)

2. Extracción de ácidos nucleicos usando kit ADN Monarch® Genomic DNA Purification (BioLabs) (Fig. 7 y 8)



Fig. 7. Extracción de ácidos nucleicos (parte 1)

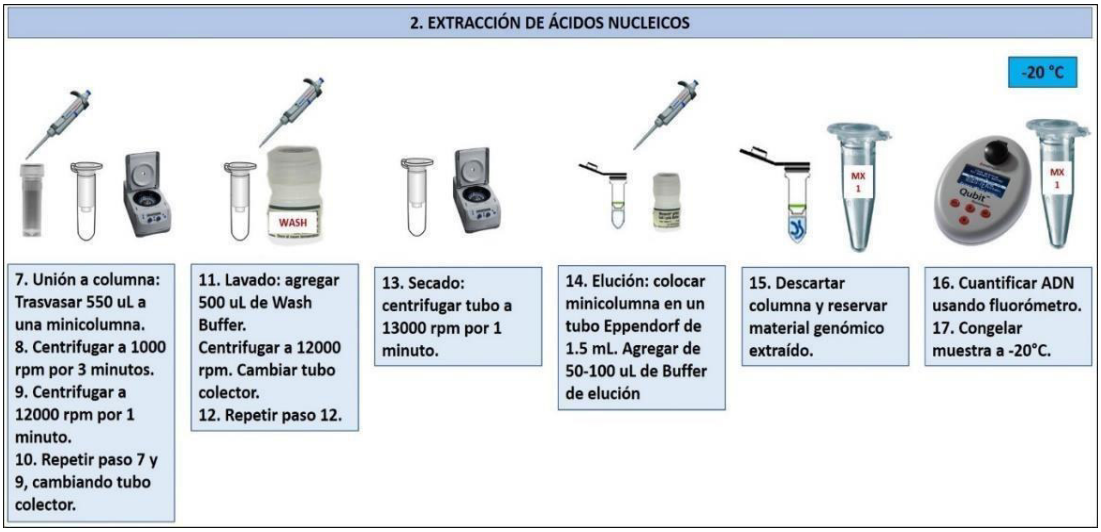


Fig. 8. Extracción de ácidos nucleicos (parte 2)

3. Amplificación de material genómico por qPCR, usando kit *Mycobacterium tuberculosis complex, Genesig® Advanced* Kit (Fig. 9).

   La amplificación del material genómico se realizó en 2 fechas. Así, se asignó como Grupo 1 a la primera fecha y Grupo 2 a la segunda fecha. La tabla 2 detalla las muestras que pertenecían a cada grupo.

   Cabe mencionar, que sólo la muestra 2 (líquido sinovial) se procesó por duplicado, variando el volumen inicial de extracción (200 µ L y 1 mL), con el fin de verificar si se obtenía mayor concentración de ADN. Para la qPCR del Grupo 1, se usó el ADN extraído a partir de 200 µL; y para la qPCR del Grupo 2, se usó el ADN extraído a partir de 1 mL.

Tabla 2

Grupos para la amplificación de muestras por qPCR

Grupo 1 (Primera fecha)
2. LÍQUIDO SINOVIAL
4. TEJIDO PULMONAR
6. POST ASPIRADO
7. BIOPSIA DE MAMA
8. LAVADO BRONQUIAL
9. SECRECIÓN DE MAMA
10. LCR
13. ESPUTO DMS

GRUPO 2 (segunda fecha)
1. LÍQUIDO PLEURAL
3. ESPUTO
5. ASPIRADO BRONQUIAL
2. LÍQUIDO SINOVIAL (concentrado 1 mL)

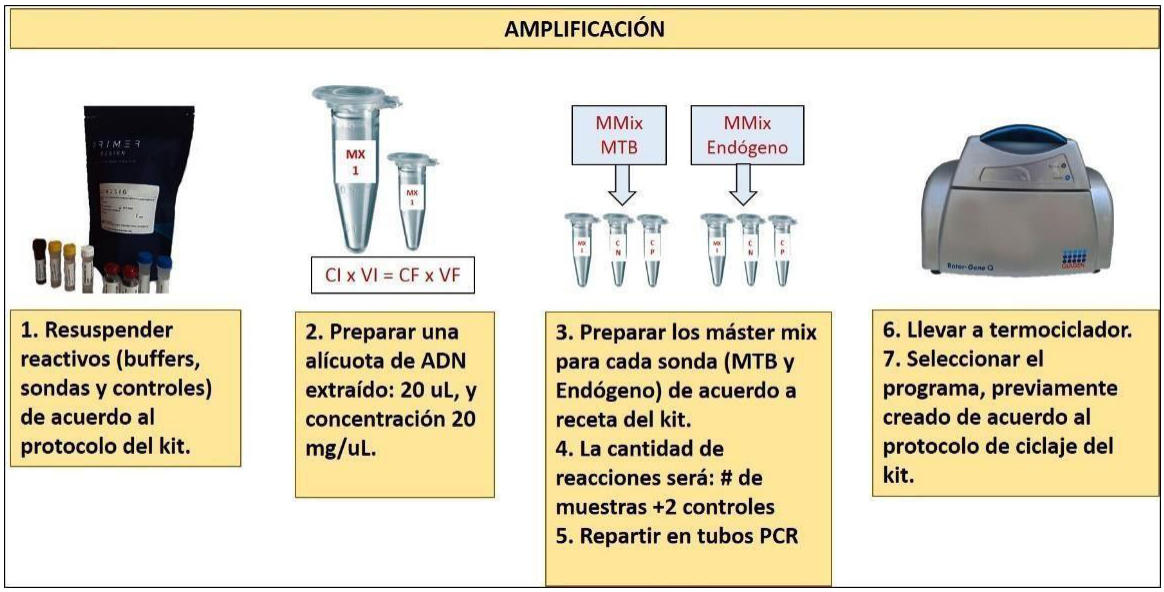


Fig. 9. Amplificación de material genómico por qPCR

V. RESULTADOS

V.1. Implementación del laboratorio para el procesamiento de muestras para diagnóstico de tuberculosis.

1. Se brindó 2 áreas contiguas en el tercer piso del edificio (ver Fig. 10), que previamente eran usadas como oficinas administrativas.

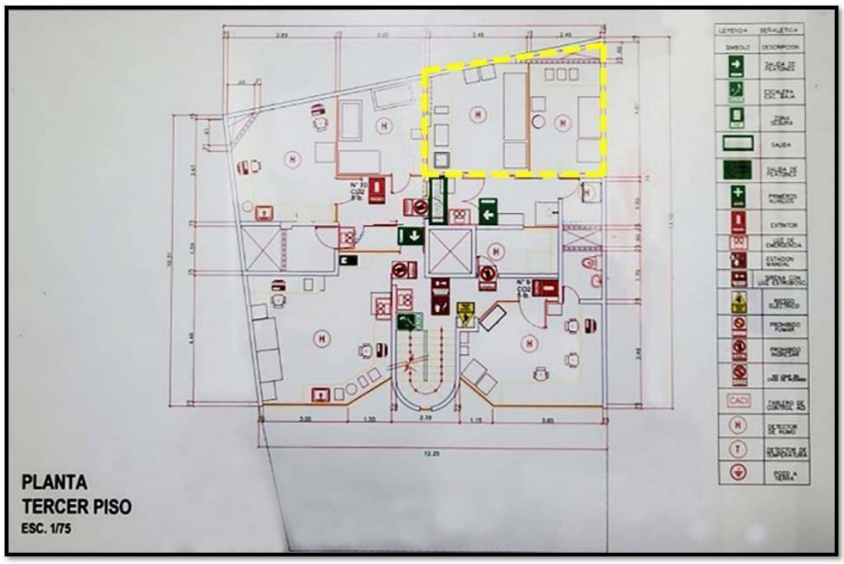


Fig. 10. Plano del piso donde se ubicará el Laboratorio de proceso de muestras infecciosas. Las líneas punteadas amarillas indican el espacio asignado para la implementación.

2. Distribución del laboratorio: sobre estos dos ambientes, se diseñó la distribución de áreas con las condiciones que exige el “Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis de la OMS”.

Así, el laboratorio quedó distribuido en las siguientes áreas (ver Fig. 11):

1) Esclusa para colocación de EPP del personal operativo
2) Paso de muestras 1
3) Recepción de muestras en refrigerador
4) Paso de muestras 2
5) Zona de extracción de material genómico
6) Equipo Genexpert
7) Zona de Lavado y desinfección del personal
8) Almacén de materiales y reactivos
9) Eliminación de residuos biocontaminados

Cabe resaltar que, el Laboratorio de Biología Molecular, ya contaba con un área de Amplificación de material genómico ubicado en el cuarto piso (para tumores de tejidos sólidos, sangre periférica y médula ósea). El ADN de las muestras extraídas para la prueba qPCR fueron amplificadas en ese piso.

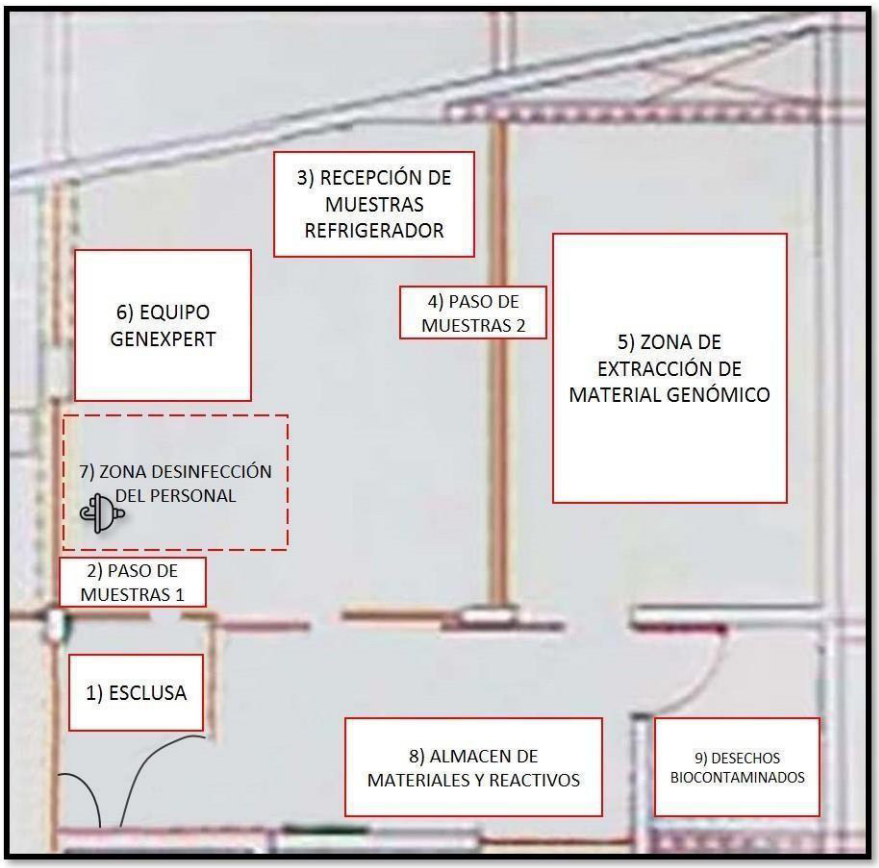


Fig. 11. Diseño de distribución de áreas en el laboratorio para el proceso de muestras

3. Se entregó para cada área de trabajo, los materiales, reactivos y equipos solicitados. Se detalla en Tabla 3.

Tabla 3

Materiales, reactivos y equipos entregados

Área		Equipos	Materiales y reactivos
1)	Esclusa para colocación de EPP del personal operativo	Luz UV en techo	Guantes de nitrilo, respirador con filtros # 2097, mamelucos descartables, cubrecalzado, gorro descartable, mandil descartable azul con puño, piseta con etanol al 70%, papel toalla, tacho rojo de piso con pedal, marcador indeleble
2)	Paso de muestras 1	-	Bandeja para entrega documentación en papel (órdenes médicas, cargos internos)
3)	Recepción de muestras en refrigerador	Refrigerador de 2-8°C con termómetro calibrado, luz UV en techo, termohigrómetro ambiental calibrado	-
4)	Zona de extracción de material genómico	Cabinas (grande y pequeña) de bioseguridad de clase II tipo A2 conectadas a UPS, centrífuga refrigerada para tubos de 50 mL,	Guantes de nitrilo, papel toalla, pisetas, etanol al 70% solución de

		centrífuga refrigerada para tubos 2 mL, micropipetas con volúmenes variables y calibradas vórtex de mesa, termobloque con agitador y calibrado a de 56°C, refrigerador 2-8°C con termómetro calibrado, temporizador calibrado, termohigrómetro ambiental calibrado, luz UV en techo	hipoclorito de sodio al 3%, tachos rojos de 8 L, tacho rojo de piso con pedal, tubos falcon de 15 mL y 50mL, microtubos con taparrosca de 2 mL, racks para tubos de 2mL, 15 mL y 50 mL, bisturí #25, placas Petri, pipetas Pasteur descartables de 1 mL y 3 mL, punteras con filtros de 20 µL, 200 µL y 1 mL; marcador indeleble, suero fisiológico, buffers para descontaminación, kit de extracción de ADN *Monarch® Genomic DNA Purification* (BioLabs), kit Xpert MTB-Rif Ultra.
5)	Paso de muestras 2	-	Racks para microtubos

6)	Equipo Genexpert	Equipo Genexpert de 4 módulos, laptop, impresora y UPS, luz UV en techo	Tachos rojos de 8L y de piso con pedal, guantes de nitrilo.
7)	Almacén de materiales y reactivos	Refrigerador de 2-8 °C con termómetro calibrado, luz UV en techo, termohigrómetro ambiental calibrado	Mueble para almacenamiento de material consumible no refrigerado.
8)	Zona de Lavado y desinfección del personal	Lavadero con pedal, jabón desinfectante a base de Gluconato de clorhexidina al 4% con pedal, luz UV en techo	Papel toalla
9)	Eliminación de residuos biocontaminados	Autoclave, luz UV en techo, estufa para control de autoclave	Tachos grandes con ruedas

4. Instalación de ventilación mecánica y fluorescentes de luz UV en techos: estos requerimientos fueron coordinadas y realizadas por el área de Infraestructura y Servicios Generales de Unilabs, quienes a su vez contrataron a una empresa especializada para la instalación de estos sistemas. La vigilancia de estas instalaciones, se realizaba a través de dos equipos instalados al ingreso del laboratorio (botón de encendido de la presión negativa y botón de encendido de luz UV con temporizador).

5. Sistema de Gestión de Calidad

   Se siguió los lineamientos del Sistema de Gestión de Calidad ISO 9001:2015. De esta manera, se incorporó los formatos para los registros correspondientes, tales como:

   - Registro de temperatura
   - Registro de humedad ambiental
   - Registro diario de uso de centrífugas

- Registro del mantenimiento diario de equipos
- Registro del check-list de luz UV
- Registro de uso de cabina de bioseguridad biológica
- Registro de uso de autoclave
- Solicitud de salida no conforme e incidencias
- Registro de incidencias externas

6. Eliminación de residuos biocontaminados

Todo material usado durante el procesamiento de muestras (tachos de cabina de bioseguridad, EPPs descartables y muestras biológicas); serán autoclavados por el personal técnico encargado. La eliminación de este material, estuvo a cargo de una empresa tercera, contratada para estos fines por el área de Infraestructura y Servicios Generales de Unilabs.

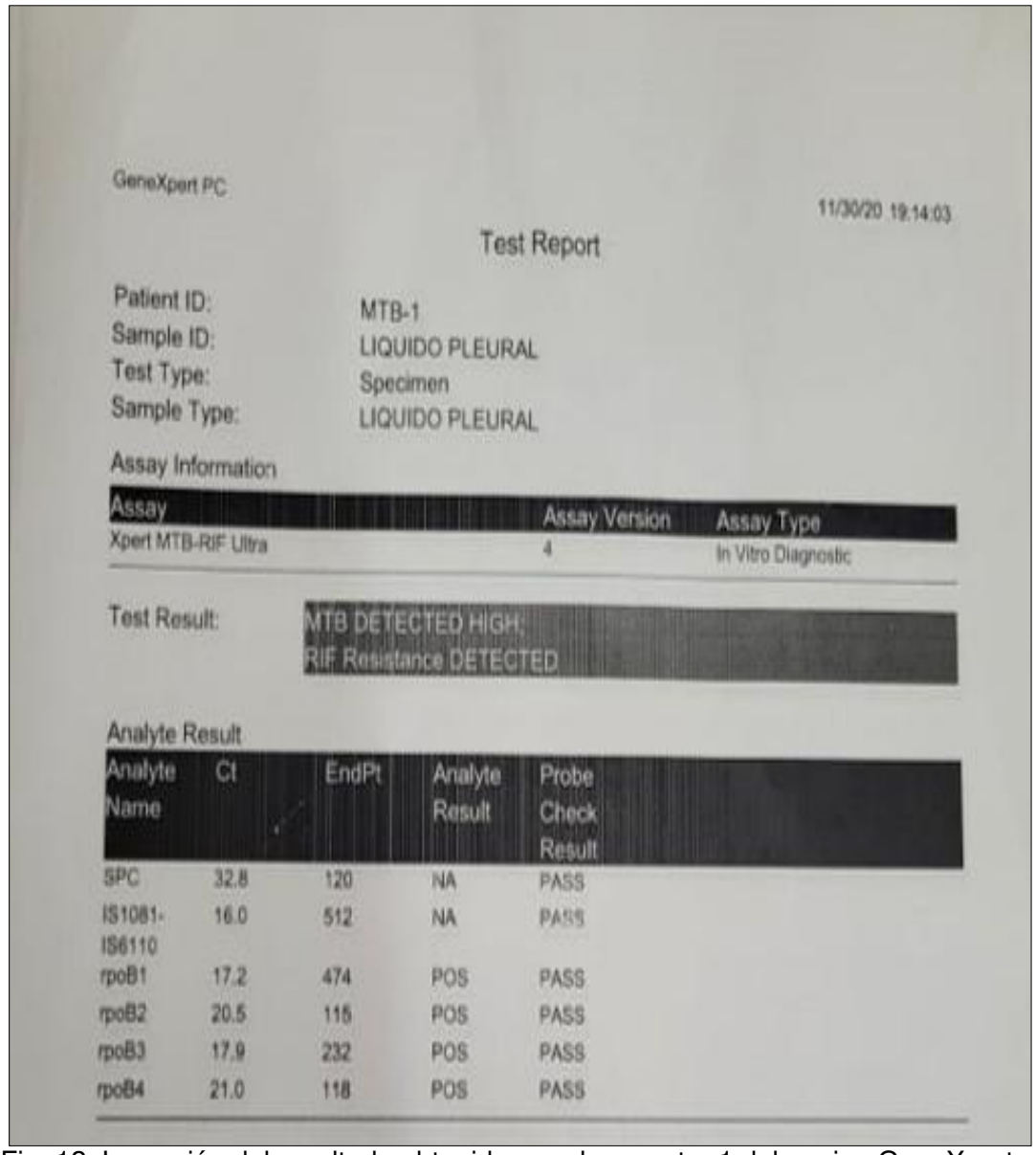
V.2. Análisis de resultados

1. Interpretación de resultados según fabricante
    i. Xpert MTB-Rif: la tabla 4 muestra la interpretación de resultados en el equipo GeneXpert, según inserto del fabricante. Además, la figura 12 muestra la impresión del resultado obtenido de la muestra 1 (líquido pleural).

Tabla 4

Interpretación de resultados para la prueba Xpert MTB-Rif Ultra, según inserto

ANALITOS			Resultado
1	Complejo Mycobacterium tuberculosis	NO	NO DETECTADO
	Carga Bacteriana	-	
	Resistencia a Rifampicina	-	
2	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA ALTA, SENSIBLE
	Carga Bacteriana	ALTA	
	Resistencia a Rifampicina	NO	
3	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA MEDIANA, SENSIBLE
	Carga Bacteriana	MEDIANA	
	Resistencia a Rifampicina	NO	
4	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA BAJA, SENSIBLE
	Carga Bacteriana	BAJA	
	Resistencia a Rifampicina	NO	
5	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA MUY BAJA, SENSIBLE
	Carga Bacteriana	MUY BAJA	
	Resistencia a Rifampicina	NO	
6	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA ALTA, RESISTENTE
	Carga Bacteriana	ALTA	
	Resistencia a Rifampicina	SÍ	
7	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA MEDIANA, RESISTENTE
	Carga Bacteriana	MEDIANA	
	Resistencia a Rifampicina	SÍ	
8	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA BAJA, RESISTENTE
	Carga Bacteriana	BAJA	
	Resistencia a Rifampicina	SÍ	
9	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA MUY BAJA, RESISTENTE
	Carga Bacteriana	MUY BAJA	
	Resistencia a Rifampicina	SÍ	
10	Complejo Mycobacterium tuberculosis	SÍ	DETECTADO, CARGA BACTERIANA TRAZAS, INDETERMINADO
	Carga Bacteriana	TRAZAS	
	Resistencia a Rifampicina	INDETERMINADO	
11	Complejo Mycobacterium tuberculosis	INVÁLIDO	INVÁLIDO
	Carga Bacteriana	-	
	Resistencia a Rifampicina	-	
12	Complejo Mycobacterium tuberculosis	-	ERROR
	Carga Bacteriana	-	
	Resistencia a Rifampicina	-	



GeneXpert PC

11/30/20 19:14:03

Test Report

Patient ID: MTB-1
Sample ID: LIQUIDO PLEURAL
Test Type: Specimen
Sample Type: LIQUIDO PLEURAL

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert MTB-RIF Ultra	4	In Vitro Diagnostic

Test Result: MTB DETECTED HIGH; RIF Resistance DETECTED

Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result
SPC	32.8	120	NA	PASS
IS1081-IS6110	16.0	512	NA	PASS
rpoB1	17.2	474	POS	PASS
rpoB2	20.5	115	POS	PASS
rpoB3	17.9	232	POS	PASS
rpoB4	21.0	118	POS	PASS

Fig. 12. Impresión del resultado obtenido para la muestra 1 del equipo GeneXpert. SPC: control de procesamiento de muestras, IS1081-IS6110: diana del ensayo, rpoB(1-4): mutaciones del gen rpoB, Ct: *cycle threshold*, POS: se detecta cambios o no en gen rpoB (1-4), PASS: resultado aceptado

ii. Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante qPCR: la tabla 5 muestra la interpretación de resultados según inserto del kit *Mycobacterium tuberculosis complex, Genesig® Advanced*.

Tabla 5

Interpretación de resultados para la prueba Detección de *Mycobacterium tuberculosis* por qPCR, según inserto. FAM: canal para el fluoróforo 6-carboxi-fluoresceína), VIC: canal para fluoróforo VIC

TARGET (FAM)	CONTROL INTERNO (VIC)	CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO	INTERPRETACIÓN
≤ 30	+ / -	+	-	POSITIVO
> 30	+	+	-	POSITIVO
> 30	-	+	-	POSITIVO
-	+	+	-	NEGATIVO

2. Resultados obtenidos

La tabla 6 muestra los resultados esperados del panel de muestras brindado por el Laboratorio de Micobacteriología

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos de la prueba Xpert MTB-Rif Ultra,y las figuras 13, 14, 15, 16 y 17 muestran los resultados obtenidos de los experimentos en el Software Rotor Gene Q versión 2.1.0.9

La tabla 8 muestra los resultados obtenidos de la prueba Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* por qPCR, respectivamente.

Tabla 6

Resultados esperados del panel de muestras brindado por el Laboratorio de Micobacteriología

Número	Tipo de muestra	Panel (muestra+cepa)	Resultado esperado	
			Complejo MTB	
			Cultivo LJ	Rifampicina
1	Líquido pleural	MDR 1569	Detectado	Resistente
2	Liquido sinovial	MDR 1569	Detectado	Resistente
3	Esputo	H37RV	Detectado	Sensible
4	Tejido pulmonar	MDRMA2019	Detectado	Sensible
5	Aspirado bronquial	H37RV	Detectado	Sensible
6	Post aspirado bronquial	Caso positivo	Detectado	Sensible
7	Biopsia de mama	R-RIF	Detectado	Resistente
8	Lavado Bronquial	MDRMA2019	Detectado	Sensible
9	Secreción mamaria	R-RIF	Detectado	Resistente
10	LCR	No cepa	No detectado	N/A
11	Cepa	M.tuberculosis H37RV	Detectado	Sensible
12	Cepa	M.chelonae	No detectado	N/A
13	Esputo DMS	No cepa	No detectado	N/A

Tabla 7

Resultados obtenidos de la prueba Xpert MTB-Rif Ultra

Número	Tipo de muestra	Xpert MTB-Rif Ultra		
		Resultado Obtenido		
		Complejo MTB		
		Resultado	Carga bacteriana	Rifampicina
1	Líquido pleural	Detectado	Alta	Resistente
2	Liquido sinovial	Detectado	Alta	Resistente
3	Esputo	Detectado	Bajo	Sensible
4	Tejido pulmonar	Detectado	Medio	Sensible
5	Aspirado bronquial	Detectado	Medio	Sensible
6	Post aspirado bronquial	Detectado	Trazas	Indeterminado
7	Biopsia de mama	Detectado	Bajo	Resistente
8	Lavado Bronquial	Detectado	Medio	Sensible
9	Secreción mamaria	Detectado	Alta	Resistente
10	LCR	No detectado	N/A	N/A
11	Cepa	Detectado	Bajo	Sensible
12	Cepa	No detectado	N/A	N/A
13	Esputo DMS	No detectado	N/A	N/A

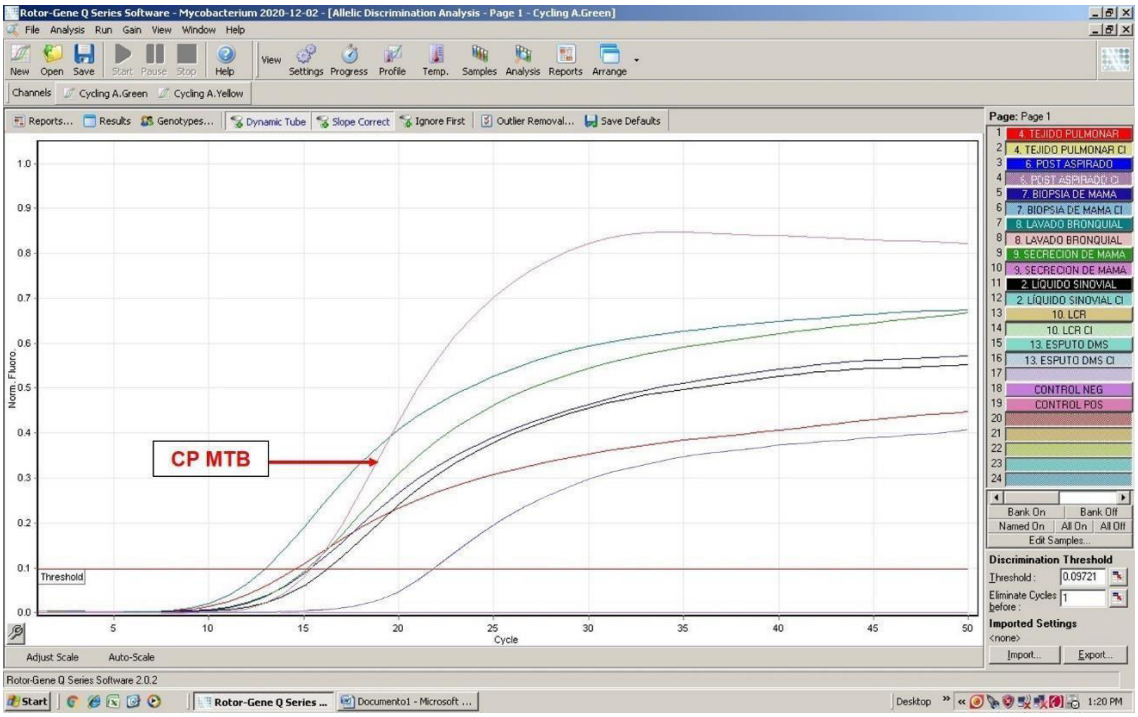


Fig. 13. Curvas de resultados para Detección de Complejo *M. tuberculosis* (Grupo 1). CP MTB: control positivo

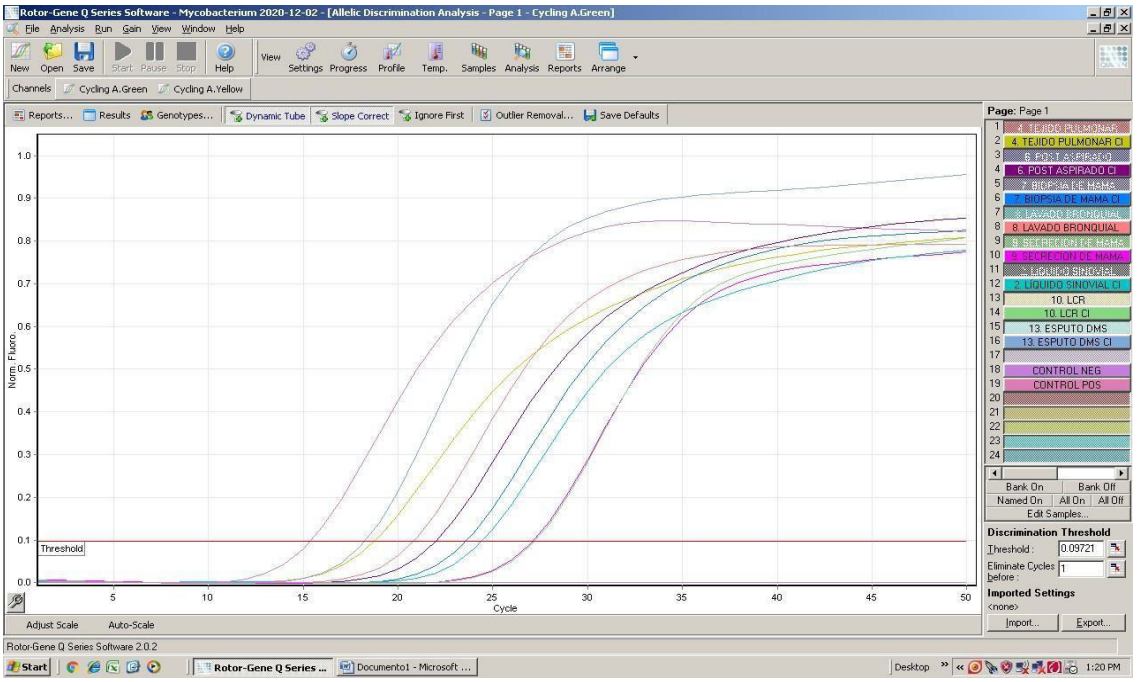


Fig. 14. Curvas para para detección de control endógeno (Grupo 1). Todas las curvas corresponden a las muestras procesadas en este experimento.

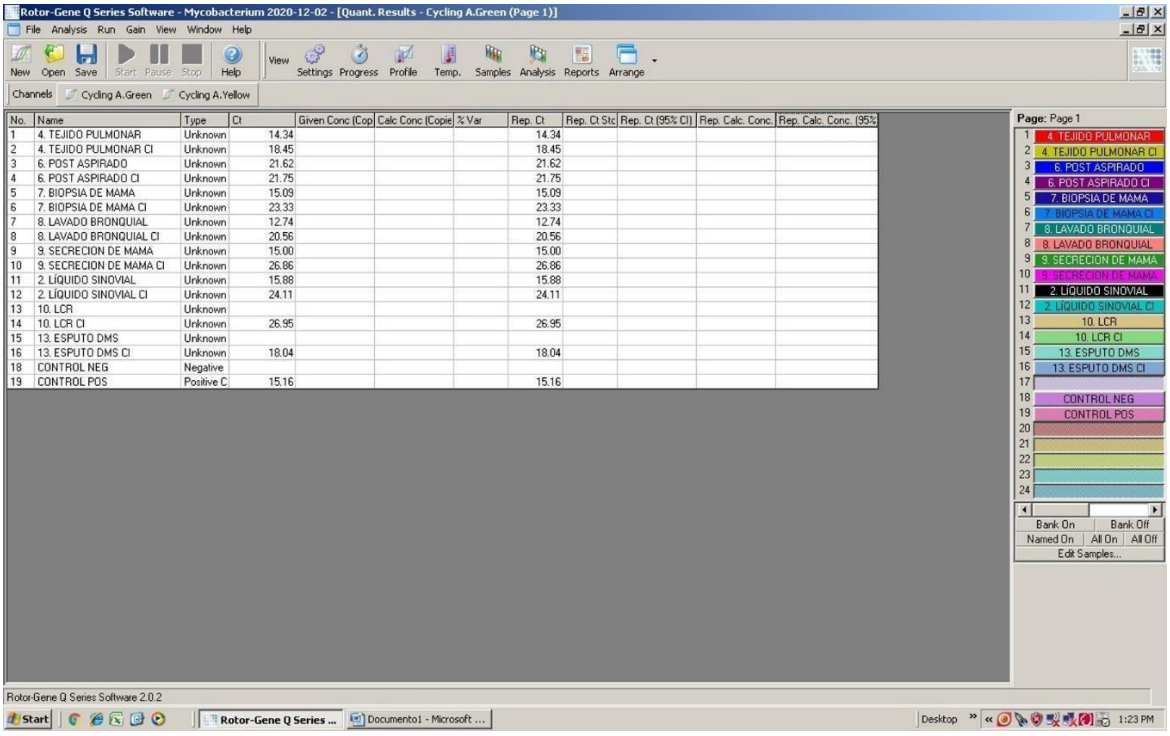


Fig. 15. Valores de Ct (*cycle threshold*) del grupo 1

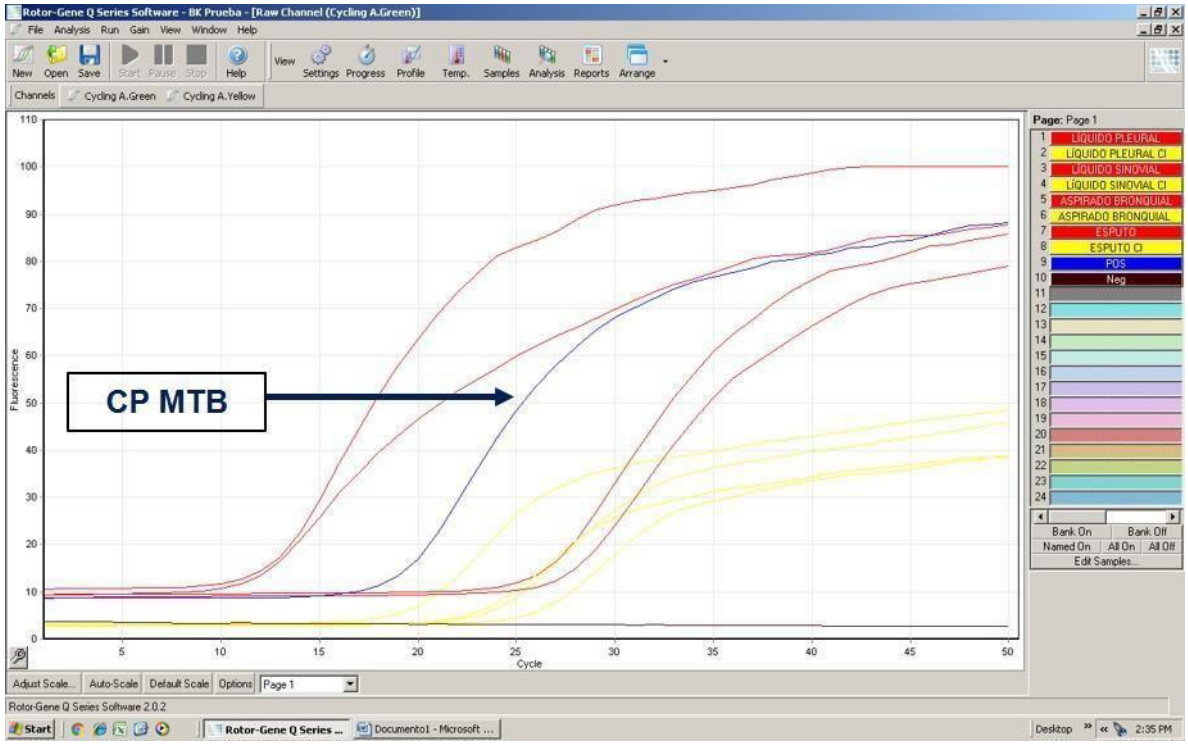


Fig. 16. Curvas qPCR del Grupo 2. Curvas rojas: casos positivo para MTB, curvas amarillas: Control endógeno que fue positivo para todas las muestras, CP MTB: control positivo para MTB.

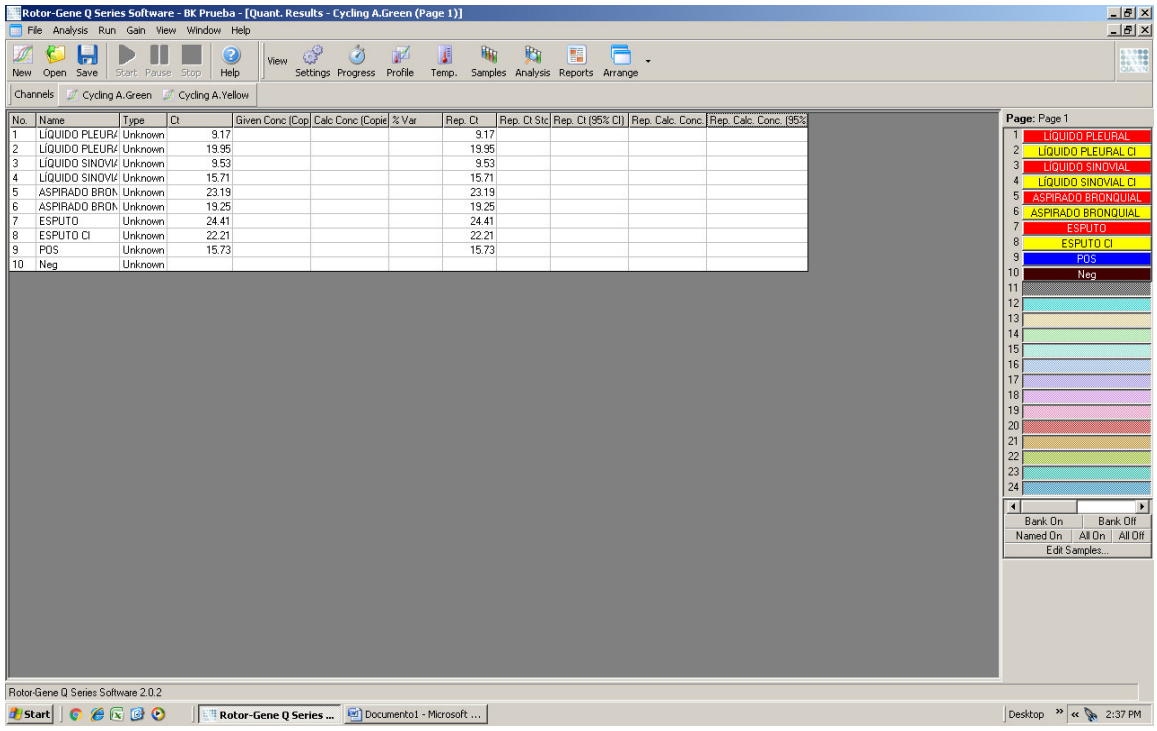


Fig. 17. Valores de Ct (*cycle threshold*) para el Grupo 2

Tabla 8

Resultados obtenidos de la prueba Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* por qPCR

Número	Tipo de muestra	qPCR	
		Resultado Obtenido	
		Complejo MTB	
		Resultado	CI
1	Líquido pleural	Detectado	Válido
2	Liquido sinovial	Detectado	Válido
3	Esputo	Detectado	Válido
4	Tejido pulmonar	Detectado	Válido
5	Aspirado bronquial	Detectado	Válido
6	Post aspirado bronquial	Detectado	Válido
7	Biopsia de mama	Detectado	Válido
8	Lavado Bronquial	Detectado	Válido
9	Secreción mamaria	Detectado	Válido
10	LCR	No detectado	Válido
11	Cepa	NSP	NSP
12	Cepa	NSP	NSP
13	Esputo DMS	No detectado	Válido

**NSP: no se procesó*

3. Análisis de resultados obtenidos

Para medir la concordancia entre los métodos, se empleó el "índice *kappa* de Cohen"(McHugh 2012). El análisis estadístico se realizó en el software SPSS 29.0.1.0. Se realizó tres mediciones del Índice *kappa* de Cohen:

a. Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*: Xpert MTB-Rif Ultra y cultivo sólido Löwenstein-Jensen (Tabla 9).
b. Sensibilidad a fármaco Rifampicina: Xpert MTB-Rif Ultra y cultivo sólido Löwenstein-Jensen (Tabla 10).
c. Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*: qPCR y cultivo sólido Löwenstein-Jensen (Tabla 11).

Tabla 9

Índice kappa para medir el nivel de concordancia de la Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* entre los métodos Xpert MTB-Rif Ultra y Cultivo Löwenstein-Jensen

Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porce
XPERT_MTB_RIF_ULTRA * CULTIVO_LJ	13	100.0%	0	0.0%	13	10

Tabla cruzada XPERT_MTB_RIF_ULTRA*CULTIVO_LJ

			CULTIVO_LJ		
			Detectado	No detectado	Total
XPERT_MTB_RIF_ULTRA	Detectado	Recuento	10	0	10
		% del total	76.9%	0.0%	76.9%
	No detectado	Recuento	0	3	3
		% del total	0.0%	23.1%	23.1%
Total		Recuento	10	3	13
		% del total	76.9%	23.1%	100.0%

Medidas simétricas

		Valor	Error estándar asintótico[a]	T aproximada[b]	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	1.000	.000	3.606	<.001
N de casos válidos		13			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Tabla 10

Índice kappa para medir el nivel de concordancia de la Sensibilidad a al fármaco Rifampicina entre los métodos Xpert MTB-Rif Ultra y Cultivo Löwenstein-Jensen

Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Sensibilidad_a_Rifampicina_Xpert_MTB_Rif_Ultra * Sensibilidad_a_Rifampicina_LJ	13	100.0%	0	0.0%	13	100.0%

Tabla cruzada
Sensibilidad_a_Rifampicina_Xpert_MTB_Rif_Ultra*Sensibilidad_a_Rifampicina_LJ

			Sensibilidad_a_Rifampicina_LJ			
			N/A	Resistente	Sensible	Total
Sensibilidad_a_Rifampicina_Xpert_MTB_Rif_Ultra	N/A	Recuento	3	0	1	4
		% del total	23.1%	0.0%	7.7%	30.8%
	Resistente	Recuento	0	4	0	4
		% del total	0.0%	30.8%	0.0%	30.8%
	Sensible	Recuento	0	0	5	5
		% del total	0.0%	0.0%	38.5%	38.5%
Total		Recuento	3	4	6	13
		% del total	23.1%	30.8%	46.2%	100.0%

Medidas simétricas

		Valor	Error estándar asintótico[a]	T aproximada[b]	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.883	.112	4.517	<.001
N de casos válidos		13			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Tabla 11

Índice kappa para medir el nivel de concordancia entre los métodos Detección del complejo *Mycobacterium* mediante qPCR y Cultivo Löwenstein-Jensen

Resumen de procesamiento de casos

	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
qPCR_MTB * Cultivo_LJ	11	100.0%	0	0.0%	11	100.0%

Tabla cruzada qPCR_MTB*Cultivo_LJ

			Cultivo_LJ		
			Detectado	No detectado	Total
qPCR_MTB	Detectado	Recuento	9	0	9
		% del total	81.8%	0.0%	81.8%
	No detectado	Recuento	0	2	2
		% del total	0.0%	18.2%	18.2%
Total		Recuento	9	2	11
		% del total	81.8%	18.2%	100.0%

Medidas simétricas

		Valor	Error estándar asintótico[a]	T aproximada[b]	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	1.000	.000	3.317	<.001
N de casos válidos		11			

a. No se presupone la hipótesis nula.

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Los resultados obtenidos para el índice *kappa*, nos indican que existe un grado de concordancia casi perfecto para los métodos relacionados a la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (k = 1.00). Para el caso de la Sensibilidad al fármaco Rifampicina, se obtuvo un valor de *kappa* de Cohen de 0.883, que indica que existe un fuerte grado de concordancia entre los métodos analizados. Cabe mencionar que sólo un resultado no fue concordante; debido a que una muestra procesada para la prueba Xpert MTB-Rif Ultra, resultó en “trazas” de carga bacteriana, lo cual no permite determinar la sensibilidad a la rifampicina. Este caso particular corresponde a la muestra 6 (post aspirado bronquial), la cual resultó ser un caso positivo de un paciente, a diferencia de las demás muestras positivas del panel, que

eran muestras de casos negativos inoculadas con cepas positivas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La tabla 12 resume estos hallazgos.

Tabla 12

Resumen de los tres análisis realizados para el Índice *kappa*

	MÉTODOS COMPARADOS		
Interpretación del índice *kappa*	Xpert MTB-Rif Ultra y cultivo sólido Löwenstein-Jensen		Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis*: qPCR y cultivo sólido Löwenstein-Jensen
	Detección complejo MTB	Sensibilidad a Rifampicina	
Índice *kappa*	1.000	0.883	1.000
Escala de valoración	> 0.90	0.80 – 0.90	> 0.90
Interpretación del nivel de concordancia	Casi perfecto	Fuerte	Casi perfecto

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo experiencia en la implementación de un laboratorio de bioseguridad de tuberculosis para actividades de mediano riesgo.

2. El flujo de trabajo diseñado quedó como estándar para las próximas pruebas de diagnóstico de patógenos infecciosos en el Laboratorio de Biología Molecular.

3. Se encontró un alto grado de concordancia entre los métodos analizados. Estos resultados permitieron aceptar el proceso completo de ambas pruebas moleculares propuestas para el diagnóstico de tuberculosis, pudiéndose ofrecer al público días después, previamente realizando las coordinaciones administrativas.

4. Se destaca los conocimientos adquiridos durante el pregrado, particularmente con los cursos de: Biología Celular, Bioquímica general, Genética General, Biología Molecular, Microbiología General, Sistemática General y Fundamentos

de Inmunología. Asimismo, se sugiere la implementación de cursos relacionados al uso, mantenimiento y calibración de instrumental de laboratorio, y Sistema de Gestión y Control de Calidad.

VII. PERSPECTIVAS

VII.1. Oportunidades de mejora aplicando el Sistema de Gestión de Calidad

- ✓ El uso de los registros "Registro de Incidencias internas y Salidas no conformes", "Registro de incidencias externas", permitieron corregir errores que se presentaron posterior a la implementación de las pruebas. Los errores más comunes fueron:
  - Volumen de muestra insuficiente para proceso
  - Demora en la entrega de muestras

VII.2. Perspectivas para implementación de nuevas pruebas y otros laboratorios

- ✓ La implementación de este laboratorio de bioseguridad, sirvió como piloto para el nuevo laboratorio dedicado de manera exclusiva a la Detección de SARS-CoV-2 durante el periodo de pandemia.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ali Akbar Velayati, P. F. (2016). Atlas of Mycobacterium Tuberculosis, Elsevier.
2. Cepheid (2017). Xpert® MTB/RIF Ultra Insert Package. **301-5987-ES**.
3. Contrera, M., G. Amaya and C. Guetiérrez (2021). Diagnóstico de Tuberculosisutilizando las nuevas técnicas moleculares rápidas en Uruguay Xpert MTB/RIF Ultra. . Laboratorio Nacional de Referencia - Programa Nacional de Tuberculosis CHLA-EP - Uruguay.
4. Kubica, G. P., W. E. Dye, M. L. Cohn and G. Middlebrook (1963). "Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria." Am Rev Respir Dis **87**: 775-779.
5. Macalupu Agüero, J. C. and J. A. Villegas Kergel (2022). Mortalidad de tuberculosis en el PErú del 2017 al 2021, UPCH.
6. McHugh, M. L. (2012). "Interrater reliability: the kappa statistic." Biochem Med (Zagreb) **22**(3): 276-282.
7. MINSA (2005). Manual de procedimientos - Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos. Perú.
8. MINSA (2023). BOLETÍN DE TUBERCULOSIS. **5 (6)**.
9. MINSA (2023). Norma Técnica de Salud para el Cuidado Integral de la Persona Afectada por Tuberculosis, Familia y Comunidad, Ministerio de Salud. **NTS Nº 200 - MINSA/DGIESP-2023**.
10. OMS (2013). Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis.
11. OMS (2019). "Manual de Seguridad de Laboratorio. Edición mundial - versión en inglés." Global Laboratory Initiative, Global TB Programme
12. OMS (2022). Informe mundial de la OMS sobre la tuberculosis: Perú, TB Report app. **Versión: 1.9**.
13. Rahlwes, K. C., B. R. S. Dias, P. C. Campos, S. Alvarez-Arguedas and M. U. Shiloh (2023). "Pathogenicity and virulence of Mycobacterium tuberculosis." Virulence **14**(1): 2150449.
14. Retamal M, P., A. Martinez T and P. Abalos P (2003). "Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de Mycobacterium bovis provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana " Revista chilena de infectología **20**: 166-170.
15. Sepúlveda, A., P. García-Martos, M. J. Rodríguez, A. Márquez, J. L. Puerto and A. Saldarreaga (2001). "Evaluación del medio de Stonebrink para la recuperación de micobacterias %J Revista de Diagnóstico Biológico." **50**: 189-192.
16. Vega, F. A. F. d., J. E. Moreno, J. G. Martín and J. J. P. Gutiérrez (2005). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades. 9a MICOBACTERIAS. . Procedimientos en Microbiología Clínica. .
17. WHO (2022). Global Tuberculosis Report.

IX. ANEXOS

Anexo 1

Clasificación de microorganismos por grupo de riesgo (MINSA 2005)

Grupo de riesgo	Microorganismos	Observaciones
III	**BACTERIAS, CHLAMYDIAS Y RICKETTSIAS** *Bacillus anthracis, Brucella spp., Burkholderia mallei, B. pseudomallei, Chlamydia psittaci (cepas aviares)* *Coxiella burnetii, Escherichia coli (cepas verocitotóxicas como O157:H7 uO103)* **(T)**, *Francisella tularensis tipo A, Mycobacterium tuberculosis* **(V)**, *M. africanum* **(V)**, *M. bovis (excepto la cepa BCG)* **(V)**, *M. leprae, M. microti* **(*)**, *M. ulcerans* **(*)** *Rickettsia akari* **(*)**, *R. canada* **(*)**, *R. montana* **(*)**, *R. conorii, R. mooseri, R. prowazekii, R. rickettsii, R. tsutsugamushi, Salmonella typhi* **[V (*)]**, *Shigella dysenteriae (tipo 1)* **[T (*)]** *Yersinia pestis* **(V)**	V: vacuna eficaz disponible. T: producción de toxinas. (*): Normalmente no infecciosos a través del aire.
	HONGOS *Blastomyces dermatitidis, Cladophialophora bantiana.* *Coccidioides immitis* **(A)**, *Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis.*	A: Posibles efectos alérgicos.
	VIRUS ***Arenaviridae**: Complejos virales LCM-Lassa: virus de la coriomeningitis linfocítica (cepas neurotrópicas), Complejos virales Tacaribe: virus Flexal* ***Bunyaviridae**: Virus Oropouche, Virus de la encefalitis de California, Virus Belgrade Virus sin nombre (Muerto Canyon), Hantavirus, Virus Hantaan (fiebre hemorrágica de Corea), Virus Seoul, Flebovirus, Virus de la fiebre del valle Rift* **(V)** ***Caliciviridae**: Virus de la hepatitis E* **(*)** ***Flaviviridae**: Virus de la encefalitis del valle Murray, Virus de la encefalitis de las garrapatas de Europa Central* **[V (*)]**, *Virus Absettarov, Virus Hanzalova, Virus Hypr Virus Kumlinge, Virus del Dengue tipos 1-4, Virus de la hepatitis C* **[D (*)]**, *Virus de la hepatitis G* **[D (*)]**, *Virus de la encefalitis B japonesa* **(V)**, *Virus del bosque de Kyasamur* **(V)**, *Virus del mal de Louping* **(*)**, *Virus Omsk* **[V (a)]**, *Virus Powassan, Virus Rocio, Virus de la encefalitis de primavera-verano rusa* **[V (a)]**, *Virus de la encefalitis de St. Louis Virus Wesselsbron* **(*)**, *Virus del Nilo occidental, Virus de la fiebre amarilla* **(V)** ***Hepadnaviridae**: Virus de la hepatitis B* **[V, D (*)]** *Virus de la hepatitis D* **[V, D (b) (*)]** ***Herpesviridae**: Herpesvirus simiae (virus B)* ***Poxviridae**: Monkeypox virus* **(V)** ***Retroviridae**: Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)* **[D (*)]**, *Virus de las leucemias humanas de células T (HTLV) tipos 1 y 2* **[D (*)]** *Virus S1V* **[(h) (*)]** ***Rhabdoviridae**: Virus de la rabia* **[V (*)]** ***Togaviridae**: Alfavirus, Virus de la encefalomielitis equina americana oriental* **(V)**, *Virus de la encefalomielitis equina americana occidental* **(V)**, *Virus Chikungunya* **(*)**, *Virus Everglades* **(*)**, *Virus Mayaro, Virus Mucambo* **(*)**, *Virus Ndumu, Virus Tonate* **(*)**, *Virus de la encefalomielitis equina venezolana* **(V)**, *Virus no clasificados, Virus de la hepatitis todavía no identificados* **[D (*)]**	(*): Normalmente no infecciosos a través del aire. V: vacuna eficaz disponible. D: La lista de los trabajadores al agente debe conservarse durante mas de 10 años después de la ultima exposición. (a): Encefalitis transmitida por la garrapata. (b): El virus de la hepatitis D precisa de otra infección simultánea o secundaria a la provocada por el virus de hepatitis B, para poder ejercer su poder patógeno en los trabajadores. La vacuna contra el virus de la hepatitis B protegerá por lo tanto, a los trabajadores no afectados por el virus de la hepatitis B contra el virus de la hepatitis D (Delta).
	Agentes no clasificados asociados a encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE): *Enfermedad de Creutzfeldt - Jakob* **[D(d) (*)]** *Variante de la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob (CJD)* **[D (d) (*)]** *Encefalopatía espongiforme bovina (BSE) y otras TSE de origen animal afines* **[D (d,i) (*)]** *Síndrome de Gerstmann Sträussler-Scheinker* **[D (d) (*)]** *Kuru* **[D (d) (*)]**	(c) Sólo por lo que se refiere a los tipos A y B. (d): Recomendado para los trabajos de investigación. (h): No existe actualmente ninguna prueba de enfermedad humana provocada por otro retrovirus de origen símico. Como medida de precaución, se recomienda un nivel 3.

Anexo 2

Plantilla de Reporte de Resultados propuesta para prueba Xpert-MTB-Rif de un resultado No detectado.

DETECCIÓN / RESISTENCIA MTB - GENEXPERT

CATEGORIA: XPERT-MTB

EXAMEN SOLICITADO:

DETECCION / RESISTENCIA MTB - GENEXPERT

MUESTRA:

RESULTADO:

COMPLEJO Mycobacterium tuberculosis	: NO DETECTADO
CARGA BACTERIANA	: ---
RIFAMPICINA	: ---

INTERPRETACION

NO SE DETECTÓ PRESENCIA DE ADN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

METODOLOGÍA:

Xpert MTB/RIF Ultra es una prueba de diagnóstico in vitro de PCR en tiempo real que detecta en simultáneo la presencia del del ADN del complejo de Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti y M. pinnipedii), y sus mutaciones asociadas con la resistencia a la Rifampicina del gen rpoB.

Anexo 3

Plantilla de Reporte de Resultados propuesta para prueba Xpert-MTB-Rif de un resultado Detectado, Sensible con alta carga bacteriana

DETECCIÓN / RESISTENCIA MTB - GENEXPERT

CATEGORIA: XPERT-MTB

EXAMEN SOLICITADO:

DETECCION / RESISTENCIA MTB - GENEXPERT

MUESTRA:

RESULTADO:

COMPLEJO Mycobacterium tuberculosis	: **DETECTADO**
CARGA BACTERIANA	: **ALTA**
RIFAMPICINA	: **SENSIBLE**

INTERPRETACION

SE DETECTÓ PRESENCIA DE ADN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CON ALTA CARGA BACTERIANA.
NO SE DETECTÓ LA RESISTENCIA A LA RIFAMPICINA.

METODOLOGÍA:

Xpert MTB/RIF Ultra es una prueba de diagnóstico in vitro de PCR en tiempo real que detecta en simultáneo la presencia del del ADN del complejo de Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti y M. pinnipedii), y sus mutaciones asociadas con la resistencia a la Rifampicina del gen rpoB.

Anexo 4

Plantilla de Reporte de Resultados propuesta para prueba Xpert-MTB-Rif de un resultado Detectado, Indeterminado con alta trazas de carga bacteriana

DETECCIÓN / RESISTENCIA MTB - GENEXPERT

CATEGORIA: XPERT-MTB

EXAMEN SOLICITADO:

DETECCION / RESISTENCIA MTB - GENEXPERT

MUESTRA:

RESULTADO:

COMPLEJO Mycobacterium tuberculosis	: **DETECTADO**
CARGA BACTERIANA	: **TRAZAS**
RIFAMPICINA	: **INDETERMINADO**

INTERPRETACION

SE DETECTÓ PRESENCIA DE ADN DEL COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CON TRAZAS DE CARGA BACTERIANA, LA CUAL NO PERMITE LA DETECCIPON DE LA RESISTENCIA A LA RIFAMPICINA

METODOLOGÍA:

Xpert MTB/RIF Ultra es una prueba de diagnóstico in vitro de PCR en tiempo real que detecta en simultáneo la presencia del del ADN del complejo de Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. bovis BCG, M. microti y M. pinnipedii), y sus mutaciones asociadas con la resistencia a la Rifampicina del gen rpoB.

Anexo 5

Plantilla de Reporte de Resultados propuesta para prueba Detección de *Mycobacterium tuberculosis* por qPCR, de un resultado No detectado.

DETECCIÓN MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

CATEGORIA: DETECCION MTB-LIQUIDOS

EXAMEN SOLICITADO:

DETECCIÓN MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

MUESTRA:

RESULTADO:

COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: NO DETECTADO

INTERPRETACION

AUSENCIA DE ADN DEL COMPLEJO Mycobacterium tuberculosis.

METODOLOGÌA:

Se realizó la detección del ADN de todos los miembros del complejo Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. microti y M. canettii), mediante el sistema PCR en tiempo Real, el cual cuenta con aprobación CE y para uso en diagnóstico in vitro (IVD).

Anexo 6

Plantilla de Reporte de Resultados propuesta para prueba Detección de *Mycobacterium tuberculosis* por qPCR, de un resultado Detectado.

DETECCIÓN MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

CATEGORIA: DETECCION MTB-LIQUIDOS

EXAMEN SOLICITADO:

DETECCIÓN MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

MUESTRA:

RESULTADO:

COMPLEJO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: **DETECTADO**

INTERPRETACION

PRESENCIA DE ADN DEL COMPLEJO Mycobacterium tuberculosis.

METODOLOGÍA:

Se realizó la detección del ADN de todos los miembros del complejo Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis, M. africanum, M. bovis, M. microti y M. canettii), mediante el sistema PCR en tiempo Real, el cual cuenta con aprobación CE y para uso en diagnóstico in vitro (IVD).