

INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE *Mycobacterium tuberculosis*

ITT -CNSP-527

Elaborado por : CNSP Blgo. Eddy Valencia Torres


Revisado por : CNSP Blgo. Edson Pacheco Ascencio (Revisor técnico).
CNSP Blgo. Romeo Pomari Juarez (Revisor técnico).
CNSP Blgo. Miriam Alarcón León (Revisor técnico).
CNSP Blgo. Joseph Huayra Niquén (Revisor técnico).
CNSP Dra. Blgo. Zully Puyén Guerra (Revisor técnico).
CNSP Blga. Gabriela Salinas Coronel (Revisor formal).

Aprobado por : CNSP Med. María Luz Miraval Toledo

RD N° 282 -2019-DG-CNSP/INS

Fecha: 17/10/2019



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

1. DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD

1.1 OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE ESPUTOS.

1.1.1 Obtención de la muestra esputo:

El personal encargado de tomar la muestra debe protegerse utilizando los equipos de protección personal.

Calidad: una muestra adecuada es aquella que proviene del árbol bronquial, y es obtenida después de un esfuerzo de tos.

Cantidad: la muestra debe tener un volumen aproximado de 3 a 5 mL. obtenido de tres expectoraciones sucesivas, salvo justificadas excepciones.

Envase:

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


Número de muestras y momento de recolección:

Se debe examinar dos muestras de esputo por cada sintomático respiratorio, según Norma Técnica de Salud (NTS N°104-MINSA/DGSP-V.01) del Ministerio de Salud (MINSA), aprobada mediante RM N°715-2013/MINSA. La primera muestra debe obtenerse en el momento de la consulta y la segunda al día siguiente al despertar por la mañana. Si la sospecha de tuberculosis (TB) aún persiste, es necesario realizar el seguimiento diagnóstico con el estudio de más muestras. Para el control del tratamiento examinar una muestra mensualmente mientras dure la terapia antituberculosis.

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

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



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

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

b. **Segunda muestra:** el personal de salud entrega un envase al paciente, para la obtención de la segunda muestra. Esta se toma al día siguiente al despertar en ayunas, enjuagándose previamente la boca, solamente con agua, sigue la misma explicación que dio el personal de salud, para la obtención de la primera muestra. Una vez obtenida la muestra de esputo, el paciente cierra bien la tapa del envase, coloca en una bolsa de plástico y lo lleva a la estrategia sanitaria de tuberculosis para que se remita al laboratorio inmediatamente con la solicitud de investigación bacteriológica completamente llenada.

1.1.2 **Conservación de la muestra:**

La muestra de esputo, debe procesarse de inmediato después de la obtención, si no es posible procesar el mismo día, conservar en refrigeración a 2- 8 °C, hasta los 7 días; sin embargo, para la prueba molecular de ensayo de sonda en línea, el tiempo de recolección no debe ser mayor a las 72 horas. En aquellos casos que no se pueda procesar la muestra y se requiere realizar el cultivo, el tiempo entre la toma de la muestra de esputo y su procesamiento no debe ser mayor de 05 días.

1.1.3 **Transporte de las muestras:**

En el transporte de las muestras debe tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- Siempre se debe de usar contenedores de triple embalaje
- Proteger la muestra del calor excesivo y de la luz solar
- Verificar el cierre hermético de la tapa de los envases para evitar los derrames de la muestra.
- Cada envío debe ser acompañado con el formato de solicitud de investigación bacteriológica, verificando que el número de muestras corresponda al número de solicitudes.
- Contar con un servicio de movilidad para el transporte de muestras que incluya el itinerario y cronograma para el recojo de las mismas en todos los establecimientos de salud de su jurisdicción.

1.1.4 **Transporte de muestras en el nivel local:**

- El transporte de muestras dentro del establecimiento de salud, se realiza utilizando cajas de acero inoxidable; todas las estrategias de TB del MINSA cuentan con este material. (Fig. 1).




	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01



Fig. 1

- En el caso de que se requiera transportar la muestra fuera del establecimiento de salud, utilizar contenedores de plástico resistentes, que incluyen porta-frascos con divisiones para colocar los envases. El transporte está a cargo del personal de salud, para disminuir cualquier accidente en el transporte y asegurar la muestra (Fig. 2).




Fig. 2

1.1.5 Transporte de muestras al Laboratorio Regional (LR):

- Para el transporte de muestras de esputo desde los laboratorios de nivel local al LR, se realizan utilizando contenedores de triple embalaje que incluye contenedores de plástico resistente y porta-frascos con divisiones para colocar los envases. Cada muestra debe colocarse en una bolsa de plástico, anudar o sellar la bolsa. El transporte de muestras de esputo debe realizarse en cadena de frío.
- Las muestras de esputo que ameriten para la prueba molecular de ensayo de sonda en línea, deben llegar al laboratorio dentro de las 24 a 72 h. Se recomienda para el caso de las regiones cálidas, el transporte se realice en cadena de frío (Fig. 3).



Fig. 3. Sistema de triple embalaje a cadena frío.

	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

1.1.6 Transporte de muestras al laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud (LRNM-INS)

- Para el transporte de muestras de esputo, procedentes de los laboratorios hacia el LRNM, se utiliza contenedores de triple embalaje tal y como se muestra en la Fig. 4. Según lo indicado en la NTS N° 153-MINSA/2019/INS: "Norma Técnica de Salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias Infecciosas"
- Etiquetar el embalaje indicando la posición que debe mantener las muestras, nombre de la institución, dirección exacta y teléfono.
- Las muestras deben llegar al laboratorio dentro de las 24 a 72 h.

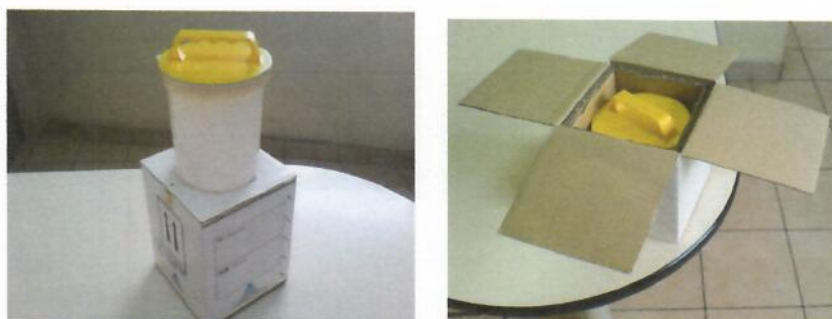


Fig 4. Sistema de triple embalaje a Temperatura ambiente.

1.1.7 Recepción de la muestra:


La recepción de muestra se realiza cumpliendo las medidas de bioseguridad. Las muestras deben de estar protegidas de la luz solar en el área destinada a la recepción de muestras de la estrategia sanitaria de TB de cada región.

- Verificar que las muestras estén bien rotuladas y coincidan a las solicitudes de examen.
- Si existe un pequeño derrame del contenido, proceder a limpiar el envase con lejía al 5 % o desinfectante de uso de laboratorio.
- Si el derrame es masivo en el paquete, debe descontaminar y descartar la muestra previa esterilización en autoclave.
- Evaluar la cantidad y la calidad de las muestras.
- Notificar y hacer las recomendaciones al establecimiento de Salud remitente sobre las deficiencias de los envíos como, identificación, calidad, volumen o la forma del envío.

1.2 OBTENCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis*:

Consiste en aislar el bacilo de la TB en medio sólido o líquido. Representa una herramienta útil para el diagnóstico de TB. Además, constituye la base para realizar la prueba de susceptibilidad a drogas (PSD) de primera y segunda línea e identificación de micobacterias.



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

1.2.2 Cultivos Sólidos

Los medios de cultivo sólido (Lowenstein-Jensen u Ogawa) contienen proteínas del huevo, cuyos ingredientes como la L-asparagina y el ácido glutámico son utilizados como fuente de nitrógeno y como fuente de carbono, respectivamente. Ambos utilizan el colorante verde de malaquita como inhibidor de la flora asociada.

1.2.3 Cultivo en medio Lowenstein-Jensen (LJ).

El medio LJ no presenta entre sus componentes sales que le proporcionen características amortiguadoras de álcalis o bases fuertes, por lo que es necesario un tratamiento previo con una solución alcalina como el hidróxido de sodio (NaOH) al 4% y un agente mucolítico como el N-acetil L-cisteína (NALC) para el aislamiento de Micobacterias.

Procedimiento de digestión y descontaminación de la muestra.

Este procedimiento se realiza según las metodologías de ensayo vigentes.

Siembra e Incubación

- Realizar la siembra en uno o dos tubos de medio de cultivo Löwenstein-Jensen, a razón de 0.2 mL por tubo.
- Rotular con la fecha y los datos correspondientes a cada tubo.
- Colocar los tubos con la siembra en una estufa incubadora a 37 °C.
- Realizar la primera lectura a las 48 horas, y ajustar las tapas, para observar si existe contaminación.

Lectura de resultados

Las colonias de *M. tuberculosis* se visualizan generalmente de 2 a 3 semanas de incubación; las colonias típicas son de color crema, rugosa con aspecto de coliflor, se desarrollan en la superficie del medio y no cambian de color.


Escala semi-cuantitativa para reporte de resultados.

Negativo	No se observan colonias, después de 8 semanas de incubación.
N° de colonias	* 1 a 19 colonias en el total de tubos con siembra
+	De 20 a 100 colonias.
++	Colonias separadas más de 100 colonias.
+++	Colonias incontables (desarrollo confluyente)
Contaminación	Tubos con siembra, muestran contaminación con otros gérmenes.

* En caso de colonias contables hasta 19 en los tubos con siembra. Si supera 19 colonias en los tubos, para transformar la lectura en escala de cruces se promedia el desarrollo en todos los tubos.

Se debe realizar frotis de las colonias que no tienen morfología típica.



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

1.2.4 Cultivo en medio Ogawa

Medio de cultivo con pH ácido (6.2 – 6.4), requiere un tratamiento previo con una solución alcalina como el hidróxido de sodio (NaOH) al 4% para el aislamiento de Micobacterias.

Procedimiento de digestión y descontaminación de la muestra

- Colocar las muestras numeradas en orden creciente sobre la mesa de trabajo, poner en una gradilla igual cantidad de tubos estériles numerados con la misma secuencia de las muestras.
- Trasvasar en cada tubo 1 a 2 mL de muestra de esputo o de suspensión obtenida por macerado y en caso de muestras centrifugadas emplear todo el sedimento, agregar 4 mL de solución estéril de hidróxido de sodio (NaOH) al 4 % (1:4).
- Dejar de 35° a 37°C por 20 minutos en estufa (o Baño María con agitador).

Siembra e Incubación

- Inocular 0.1 mL (por tubo) en 2 tubos de medio de Ogawa, bañar toda la superficie del medio.
- Colocar los tubos en una bandeja de metal de fondo inclinado, e incubar en estufa a 35° a 37°C.
- Después de 48 horas revisar los tubos y ajustar las tapas, además de verificar si algún tubo está contaminado, alcalinizado (color blanco amarillento) o acidificado (color azul oscuro) por mala neutralización de la muestra.
- El desarrollo de colonias antes de 48 horas es indicativo de contaminación, algunas veces el medio se licua por acción de gérmenes proteolíticos.
- Revisiones posteriores se realizarán durante la incubación, a los 7, 15, 21, 30 y 60 días.

Lectura de resultados

Se realizará según la Escala semi-cuantitativa para reporte de resultados del punto 2.1.1. Cultivo en medio Lowenstein-Jensen (LJ).


1.2.5 Cultivo en medio líquido BACTEC MGIT.

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

Procedimiento de digestión y descontaminación de la muestra.

Seguir los pasos según las metodologías de ensayo vigentes.



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

Siembra en medio liquido BACTEC MGIT.

Seguir los pasos según las metodologías de ensayo vigentes.

Lectura en medio liquido BACTEC MGIT.

Seguir los pasos según las metodologías de ensayo vigentes.

Interpretación de resultados.

Seguir los pasos según las metodologías de ensayo vigentes.

1.2.6 Conservación de la muestra:

En cuanto a cultivos positivos, una vez realizado la lectura, con un tiempo de no mayor a 60 días (tiempo desde la fecha de siembra hasta la lectura final), deben ser enviados al laboratorio que corresponda, para la realización de la prueba de susceptibilidad a drogas.

1.2.7 Transporte de las muestras:

Se deben respetar la reglamentación internacional y nacional vigente. El Programa de Control de Tuberculosis y el Nivel de Referencia Nacional de la red de laboratorios deben procurar lo necesario y establecer una organización que permita que los cultivos puedan ser transportados con bioseguridad y, a la vez, en forma rápida y sin impedimentos.


En el transporte de las muestras debe tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- Proteger la muestra del calor excesivo y la luz solar
- Todos los cultivos deben ser transportados en contenedores de triple embalaje
- Se debe contar con un servicio de transporte de muestras organizado y estructurado que tome en consideración los aspectos de bioseguridad que son necesarios para el transporte de este tipo de sustancias infecciosas; según lo indicado en la NTS N° 153-MINSA/2019/INS: "Norma Técnica de Salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias Infecciosas"

1.2.8 Transporte de muestras del Laboratorio que hace el cultivo hacia el Laboratorio Regional:

- Para el transporte de cultivos positivos desde el laboratorio que realiza el cultivo al LRR, se realiza a través de contenedores de triple embalaje, que consta de un envase primario, secundario y embalaje exterior (Fig. 4).
- Acondicionar los tubos a enviar con triple envase, de la siguiente forma:
 - Asegurar el rótulo y el cierre hermético de la tapa del tubo que contiene el aislamiento (cultivo positivo), colocar una cinta adhesiva o parafilm alrededor de la tapa. Es el primer envase.



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

- Envolver cada tubo con material que amortigüe y pueda absorber todo el contenido del tubo en caso de accidente en tránsito, puede ser una capa de algodón de 2 cm. de espesor o material plástica con burbujas.
- Colocar el tubo así protegido dentro de un segundo envase. Debe ser rígido, impermeable, con cierre hermético y resistente a golpes y presión de gran intensidad. Puede colocarse más de un tubo dentro del segundo envase asegurando que no haya contacto entre ellos.
- Colocar los formularios de solicitud de prueba de identificación/sensibilidad dentro de una bolsa plástica.
- Ubicar el segundo envase conteniendo el/los tubos y las solicitudes dentro de un tercer envase.

1.2.9 Transporte de muestras al Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud (LRNM-INS)

- Para el transporte de muestras de cultivos positivos procedentes de los laboratorios regionales, se utiliza contenedores de triple embalaje (Figura 3).
- Etiquetar el embalaje indicando la posición que debe mantener las muestras, nombre de la institución, dirección exacta y teléfono.
- El personal del Laboratorio de Referencia desempaquetará los aislamientos en cabina de seguridad biológica y procederá a autoclavar todo el material recibido en el caso en que se hubiera producido algún accidente.
- Finalmente, para el condicionamiento de tubos seguir lo manifestado en el punto anterior.

2 FORMULARIOS

No aplica

3 CONTROL DE CAMBIOS


No aplica

4 ANEXOS

Anexo 01: Preparación de medio Lowenstein-Jensen.

Anexo 02: Preparación del medio OGAWA



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

ANEXO 01: PREPARACIÓN DE MEDIO LOWENSTEIN-JENSEN

Composición:

Fosfato monopotásico	2.4 g.
Sulfato de Magnesio	0.24 g
Citrato de Magnesio	0.6 g
L-Asparagina	3.6 g
Glicerina	12 mL
Agua destilada c.s.p.	600 mL
Huevo	1000 mL
Verde de Malaquita 2%	20 mL

Preparación de sales.

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

Preparación del Medio.

- Lavar los huevos con agua y jabón, dejar secar.
- Limpiar con algodón empapado en alcohol al 70%, dejar secar, romper uno por uno los huevos en una placa petri. Observar si se encuentran frescos, vaciar en un beaker de 2000 mL.
- Homogenizar la yema y clara del huevo. Filtrar en un beaker 1000 mL, utilizando gasa estéril de 4 capas.
- Agregar la solución acuosa de verde de malaquita al 2 % a la solución de sales.
- Agregar la suspensión de huevos homogenizados y mezclar suavemente con movimientos circulares.
- Dejar reposar el medio preparado por 30 minutos para que desaparezcan las burbujas. Cubrir con una franela de color oscuro para proteger de la luz.

Dispensar:

- Distribuir 6,5 mL de medio a tubos de 20x125 mm tapa rosca, 7,5 mL a tubos de 20 x150 mm y 5 mL. en tubos de 16x125 mm. Evitar la formación de burbujas dispensando el medio por las paredes del tubo.


Coagular:

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

Control de esterilidad:

- Colocar los medios en estufa a 37 °C por 24 horas
- Revisar los tubos para observar si existe contaminación.



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

Almacenamiento:

- Conservar los medios en refrigeración a -4°C , en una bolsa de plástico. Los medios pueden ser usados dentro del mes de su preparación.

ANEXO 02: PREPARACIÓN DEL MEDIO OGAWA

Ingredientes:

- Fosfato Monopotásico (KH_2PO_4) 3g
- Glutamato de sodio 1g
- Agua destilada 100 mL.
- Glicerol 6 mL.
- Verde de Malaquita 2% 6 mL.
- Huevo homogenizado 200 mL.

Procedimientos

Preparación de Solución de Sales:

Disolver en 100 mL. de agua destilada, el KH_2PO_4 y el glutamato de sodio y colocar en baño maría a 100°C por 30 minutos o en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Preparación de Huevo Homogenizado:

- Lavar los huevos con detergente y enjuagar con agua de caño, dejar secar en una canastilla de alambre.
- Limpiar los huevos con algodón embebido en alcohol al 70% y dejar secar.
- Romper los huevos uno por uno y verter en un vaso pequeño, para comprobar si están en buenas condiciones, de lo contrario descartar y cambiar de vaso.
- Vaciar los huevos en un beaker y homogenizar con una bagueta o palillos estériles, filtrar utilizando cuatro capas de gasa estéril.
- Adicionar 6 ml de Glicerol y 6 ml de verde de malaquita al 2% a la solución de sales enfriada a temperatura de ambiente y mezclar bien.
- Agregar el huevo homogenizado lentamente por la pared del Erlenmeyer evitando la formación de burbujas.
- Mezclar suavemente y dejar reposar por 30 minutos.


Distribución del Medio:

- Distribuir el medio en tubos de 20 x 125 mm, o 20 x 150 mm en una proporción de 6 mL por tubo, evitando la formación de burbujas.

Coagulación del Medio:

- Colocar los tubos inclinados en el coagulador a $80-85^{\circ}\text{C}$ por una hora (el coagulador debe haberse encendido previamente hasta lograr una temperatura de 85°C).



	INSTRUCCIÓN DE TRABAJO	ITT-CNSP-527
	INSTRUCCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE ESPUTO Y AISLAMIENTO DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Edición N° 01

Conservación del Medio:

- Después de la coagulación, sacar los tubos y dejar enfriar. Luego guardar en bolsas de plástico y cerrarlas herméticamente, anotando la fecha de preparación.
- Los medios pueden guardarse en el refrigerador hasta por un mes.

