

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure, likely a saint or scholar, seated and holding a book. The figure is surrounded by various heraldic symbols, including a crown at the top and several lions or other animals. The Latin motto "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CAETERA ORBIS CONSPICUA" is inscribed around the perimeter of the seal.

**“DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO DE LA TINCIÓN DE
AURAMINA-RODAMINA PARA USO RUTINARIO DEL DIAGNÓSTICO
MICROSCÓPICO DE MICOBACTERIAS”**

Seminario de Investigación

Juan Carlos Barrera Toledo
Brenda Graciela Domínguez García
Lilian Lizeth Martínez Morales

Químicos Biólogos

Guatemala, septiembre 2014

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**“DISEÑO E IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO DE LA TINCIÓN DE
AURAMINA-RODAMINA PARA USO RUTINARIO DEL DIAGNÓSTICO
MICROSCÓPICO DE MICOBACTERIAS”**

Seminario de Investigación

Presentado por

Juan Carlos Barrera Toledo
Brenda Graciela Domínguez García
Lilian Lizeth Martínez Morales

Para optar al título de

Químicos Biólogos

Guatemala, septiembre 2014.

AGRADECIMIENTOS

A Dios antes que nada, por brindarnos la oportunidad de vivir, ser la luz en nuestro camino, fuente de vida, amor, templanza y guía en este camino que tenía como objetivo cumplir uno de nuestros más grandes sueños.

A la tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala, nuestra alma mater.

Al Lic. César Roberto Conde Pereira y a la Licda. María Luisa García de López, por brindarnos su asesoría, paciencia, dedicación y apoyo en la realización del presente seminario.

A la Doctora Blanca Samayoa, por su valiosa colaboración y dedicación en la elaboración y revisión del presente trabajo.

Al Área de Tuberculosis y Hongos del laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios, por la colaboración y ayuda en cuanto a conocimientos y proporción de insumos en la realización de la parte experimental del mismo.

A todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron en la elaboración del presente seminario de investigación.

ACTO QUE DEDICO

A Dios, nuestro padre celestial por brindarme la vida, llevarme por el camino correcto, siempre estar a mi lado, ser mi pilar de amor, sabiduría, fe y esperanza en cada uno de los momentos difíciles que se me presentan.

A mi madre Roxana Toledo Vásquez, una mujer extraordinaria, que me ha enseñado que todo propósito que me trace en esta vida puedo lograrlo, media vez ponga la fe en Dios. Así también por confiar en mí y nunca dejarme solo.

A mi padre quién en vida fue Pablo de Jesús Barrera, un hombre luchador que siempre confió en mí, y quien estoy seguro que desde el cielo me sigue cuidando siéntense tan feliz como yo por este triunfo.

A mi hermana Evelyn Roxana Barrera, quien a pesar de las diferencias, estuvo a mi lado en el recorrido de esta gran experiencia, apoyándome en los distintos momentos que lo necesité.

A Noemí Ester Vásquez “mamá Mimi”, Ruth Vásquez “tía Ruth”, Ondina Solís “Ondis”, y al resto de mi familia, por su amor y apoyo incondicional.

A Isabel de María Herrera Díaz, “mi mejor amiga”, por estar a mi lado en cada momento, en las buenas, en las malas, en las peores y en las mejores; mil gracias por ser parte de mi vida y brindarme tu sincera amistad.

A mis pocos pero verdaderos amigos, por su cariño, apoyo, paciencia y por permanecer a mi lado siempre.

A mis catedráticos, por su tiempo, paciencia y por brindarme sus conocimientos al compartir conmigo no solamente clases magistrales, sino también parte de sus experiencias a lo largo de su vida laboral.

A mis compañeras de seminario Brenda y Lilian, por compartir conmigo esta gran experiencia.

Y a todas las personas que siempre me apoyaron y permanecieron a mi lado, pero no fueron mencionadas en los párrafos anteriores; quiero agradecerles por todo su apoyo.

Juan Carlos Barrera Toledo

ACTO QUE DEDICO

A Dios primero por haberme llevado siempre por el mejor camino durante todo el recorrido de la carrera. Por darme la sabiduría, fuerza y sobre todo por no dejarme sola jamás.

A mis padres Marcos Domínguez y Graciela García por ser mi más grande apoyo, por su gran paciencia, su cariño y amor. Y sobre todo por confiar en que algún día podría llegar a ser mejor en la vida.

A mis dos hijos José Andrés y Graciela Margarita, porque ellos fueron mi mayor fortaleza para seguir adelante y dar lo mejor de mí. Los amo mucho y gracias por todos esos momentos maravillosos que me han regalado.

A mis dos grandes compañeros en vida Onelio Rodas y Héctor Marroquín por haberme apoyado y confiado siempre en que yo podría salir adelante.

A mis hermanos Saida, Rudy, Sandy, Marco Antonio y Pedro, por su gran amor y apoyo. Así también por ser mis mejores ejemplos en la vida.

A mis sobrinos, los cuales a pesar de su menor edad, siempre estuvieron apoyándome cuando más los necesitaba.

A Juan Carlos Barrera, por ayudarme a ser cada día mejor con sus conocimientos y consejos, por ser siempre tan optimista y el mejor compañero y amigo. Así también a todos mis amigos que siempre me acompañaron y apoyaron.

A mis catedráticos por compartir sus conocimientos como profesionales y confiar en mis capacidades como su alumna.

A mis compañeros de seminario por haber compartido con migo esta gran experiencia y triunfo.

Y a todas esas personas que siempre estuvieron con migo y que no fueron mencionadas aquí sepan que todos guardan un lugar muy especial en mi persona y gracias por darme la oportunidad de conocerlos.

Brenda Graciela Domínguez García

ACTO QUE DEDICO

Principalmente a Dios por prestarme la vida y mostrarme el camino que él tiene trazado para mí. Brindándome la guía adecuada, la fe, la esperanza y las palabras indicadas en labios de las personas que me rodean.

A mi familia por ser un pilar firme en donde puedo descansar y apoyarme siempre.

Para mis padres que con su amor, paciencia y sabiduría hicieron de mí una mejor persona al estar siempre presentes en los momentos difíciles brindándome su mano para levantarme, su hombro para llorar cuando era necesario, sus consejos y regaños para ser fuerte y luchar día a día y así alcanzar mis metas.

A mis hermanos por ser un gran ejemplo a seguir, ser mi apoyo, y mis cómplices en el transcurso de esta gran aventura.

A la Universidad de San Carlos de Guatemala por albergarme durante mi tiempo de estudio. A mis catedráticos porque sin ellos no podría haber llegado hasta donde estoy ahora, por su paciencia, enseñanzas y sacrificio para hacer de nosotros buenos profesionales.

Por último pero no menos importante a mis compañeros de seminario porque sin ellos esto no podría ser posible, por ser tal y como son diferentes y únicos a la vez.

Lilian Lizeth Martínez Morales

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Manuel Cobar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Rodrigo José Vargas Rosales	Vocal III
Br. Lourdes Virginia Nuñez Portales	Vocal IV
Br. Julio Alberto Ramos Paz	Vocal V

ÍNDICE

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	1
II. RESUMEN	2
III. ANTECEDENTES	4
A. Generalidades de la tuberculosis	4
1. Agente causal	4
2. Forma de transmisión	5
3. Cuadro clínico	6
4. Tratamiento	7
5. Profilaxis	8
B. Epidemiología de la tuberculosis	9
C. Importancia del Área de Tuberculosis y Hongos del laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios	11
D. Diagnóstico de tuberculosis	12
1. Examen clínico	12
2. Baciloscopía (Tinción de Zielh-Neelsen/Kinyoun)	12
3. Medios de cultivo	13
E. Tinción con fluorocromos Auramina-Rodamina	15
1. Generalidades	15
2. Principio	16
3. Ventajas	16
4. Desventajas	17
5. Usos	17
6. Interferentes	17
F. Estudios realizados comparando la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) con Auramina-Rodamina (AR)	17
G. Implementación y validación del protocolo Auramina-Rodamina para el diagnóstico microscópico de micobacterias	20
1. Validación del método	20
2. Control de calidad interno	25
3. Implementación	26
4. Capacitación del personal	26
5. Verificación	28
IV. JUSTIFICACIÓN	30
V. OBJETIVOS	32
VI. HIPÓTESIS	33
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	34
VIII. RESULTADOS	42
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
X. CONCLUSIONES	52
XI. RECOMENDACIONES	53
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

XIII. ANEXOS	62
Anexo 1: Cálculo de la muestra (n)	62
Anexo 2: Cálculo de indicadores para a evaluación del desempeño de la tinción “Auramina-Rodamina”	63
Anexo 3: Índice de concordancia kappa (k)	64
Anexo 4: Procedimiento Operativo Estándar para tinción de Auramina-Rodamina	65
Anexo 5: Procedimiento Operativo Estándar para Inoculación en medio sólido Lowenstein Jensen (LJ)	68
Anexo 6: Ficha epidemiológica	70
Anexo 7: Formato para reporte e interpretación de datos	72
Anexo 8: Datos demográficos	73
Anexo 9: Resultados de ensayos diagnósticos	74
Anexo 10: Cálculos para la determinación de indicadores	75
Anexo 11: Resultados obtenidos en muestras de aspirado orotraqueal y aspirados bronquiales	83
Anexo 12: Implementación del Protocolo de la Tinción Auramina-Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias	84
Fotografía 1: Capacitación al personal del ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD (clases magistrales)	84
Fotografía 2: Capacitación al personal del ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD (practica de laboratorio)	85
Fotografía 3 -5: Realización de parte experimental	86
Fotografía 6: Interpretación de lámina positiva para diagnóstico de TB	87
Fotografía 7: Interpretación de lámina reportada como negativa para la tinción diferencial del ZN	88
Fotografía 8 - 10: Implementación del protocolo de la tinción Auramina-Rodamina en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD	89

I. Ámbito de la Investigación

Esta investigación se realizó en el Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH), del laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD), municipio de Guatemala, Guatemala.

Se implementó el protocolo de la tinción “Auramina-Rodamina” (AR), para el diagnóstico microscópico de micobacterias; en base a las recomendaciones establecidas en el trabajo de Castellanos en el 2005 (Castellanos, 2005).

II. Resumen

A pesar de los avances alcanzados a favor de la erradicación de la tuberculosis, esta enfermedad sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. El diagnóstico de la tuberculosis (TB) ha representado un verdadero desafío para el personal de laboratorio, ya que las técnicas convencionales no son lo suficientemente eficientes para el adecuado manejo y control de la enfermedad. Por tal motivo es necesario que sean desarrolladas nuevas metodologías que cuenten con mayor sensibilidad, especificidad y rapidez que las utilizadas actualmente.

El objetivo del presente estudio fue implementar el protocolo de la tinción Auramina Rodamina (AR) para uso rutinario en el diagnóstico microscópico de micobacterias, en el Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH) del laboratorio clínico del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD). Realizando un análisis de exactitud y concordancia mediante la comparación entre las técnicas de Ziehl-Neelsen (ZN) y Auramina Rodamina (AR); utilizando el cultivo en medio Löwenstein Jensen (LJ) y/o MGIT como estándar de oro para diagnóstico conclusivo.

La tinción AR presento una sensibilidad de 91.95%, especificidad 97.86%, VPP 96.46%, VPN 95.58% e índice de concordancia kappa 0.93, con respecto a la tinción de ZN, para la que se tuvieron los valores de sensibilidad 81.57%, especificidad 95.71%, VPP 94.70%, VPN 89.50% e índice de concordancia kappa 0.84.

Por lo que puede concluirse que la tinción AR presentó un desempeño superior con respecto a la tinción tradicional de ZN. Los mejores resultados fueron obtenidos en las muestras de esputos, aspirados bronquiales y aspirados orotraqueales.

Finalmente el protocolo para la tinción AR fue implementado de forma satisfactoria, luego de la capacitación y evaluación del personal, así como de la verificación en el funcionamiento de la técnica como parte del diagnóstico rutinario en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

III. Antecedentes

A. Generalidades de la tuberculosis

1. Agente causal

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por el bacilo del género *Mycobacterium* sp., el cual no es móvil, no esporula, es aerobio, sensible a la luz solar y ultravioleta; su genoma está constituido por un alto contenido de guanina y citosina; posee ácidos micólicos en su envoltura que actúan como reservas de energía, así como también en su estructura y función, son los responsables de proporcionar una protección eficaz y una impermeabilidad excepcional (Leao *et al*, 2007).

El principal agente causal de TB humana es *M. tuberculosis*, organismo del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual también incluye a *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microty* *M. canetti* (Forbes, Sahm & Wessfeld, 2002), sin embargo es importante resaltar que cualquier especie del complejo *M. tuberculosis* puede causar infección tuberculosa (Murray, 2003).

La estructura del bacilo bajo el microscopio suele ser recto o ligeramente curvo aproximadamente entre 1-10 μm de longitud y 0.2-0.6 micras de ancho. El crecimiento de la bacteria en condiciones favorables es muy lento, dividiéndose a cada 12-24 horas comparado con otras bacterias, esto debido a la impermeabilidad de la pared que limita la absorción de nutrientes (Leao *et al*, 2007).

2. Forma de transmisión

La TB se trasmite a través del aire, cuando las personas enfermas tosen, estornudan, hablan o escupen, lanzando micro gotas de saliva que contienen al agente causal; basta con inhalar unos pocos bacilos para resultar infectado. La micobacteria llega a los pulmones y es ingerida por los macrófagos alveolares, los cuales son incapaces de digerirla. La pared celular constituida de ácidos micólicos impide la fusión del fagosoma con el lisosoma y como consecuencia las micobacterias se multiplican sin control dentro del macrófago, formando granulomas caseificantes que contienen células gigantes de Langhans en forma de herradura, las cuales se almacenan en los pulmones y provocan la infección (Instituto Nacional de Salud, 2007).

American Thoracic Society (2000) indica que la mayoría de hospederos que se infectan con *Mycobacterium tuberculosis* permanecen asintomáticos; sin embargo, del 8 al 10% de todos los inicialmente infectados contraen la enfermedad o son infecciosos al no poseer una inmunidad competente (OMS, 2012).

Existen enfermedades que predisponen al paciente a adquirir tuberculosis, dentro de las que pueden mencionarse: diabetes, cáncer, insuficiencia renal crónica, silicosis y principalmente Virus de Inmunodeficiencia humana (VIH), siendo esta última donde se reportan mayor número de casos de co-infección por tuberculosis (OMS, 2010). Las personas infectadas con VIH presentan mayor riesgo de contraer tuberculosis primaria o reactivada y un segundo episodio de reinfección exógena. El VIH acelera el paso de infección por *M. tuberculosis* a enfermedad activa, esto debido a una respuesta disminuida de los linfocitos T CD4+ (Havlir & Barnes, 1999).

Una persona con tuberculosis es capaz de transmitir la enfermedad en promedio entre 10 a 15 personas más (OMS, 2012).

3. Cuadro clínico

Dentro de los síntomas más comunes de la tuberculosis se encuentran: fiebre, tos violenta, dolor torácico, problemas respiratorios y pérdida de peso; a pesar de ello muchos pacientes no presentan síntomas o los presentan en forma insidiosa, lo que dificulta el diagnóstico, especialmente en pacientes con TB extra pulmonar (tuberculosis ganglionar, gastrourinaria, ósea, linfática, abdominal, pericárdica y miliar) (Drobniewski, Pozniak & Uttley, 1995).

Del mismo modo, la TB activa se desarrolla por la reactivación de una infección latente, usualmente años después de la infección primaria o por una infección reciente que inmediatamente progresa a enfermedad activa, sucediendo este último caso principalmente en infantes y personas con VIH(Armstrong, 1995).

Múltiples factores pueden determinar la respuesta patológica a la infección, entre ellos se encuentran:

- a. Factores intrínsecos:** Son la población de linfocitos T (CD4+), la cantidad de antígeno presente en el hospedero y las características estructurales del tejido involucrado (American Thoracic Society, 2000).

b. Co-existencia de otras enfermedades: Diabetes mellitus, silicosis, patologías asociadas con inmunosupresión (American Thoracic Society, 2000).

c. Factores farmacológicos: Ingesta de corticosteroides y otras drogas inmunosupresoras (American Thoracic Society, 2000).

4. Tratamiento

Los fármacos de primera línea que se emplean para el control de la TB son: isoniacida, rifampicina, pirazinamida, etambutanol y estreptomina. A pesar de la eficacia de los mismos, existen dificultades con la eliminación del bacilo, ya que solamente son sensibles en su forma metabólicamente activa. También existen subpoblaciones de bacilos que se activan de modo transitorio, durante lapsos muy cortos, provocando mutantes farmacorresistentes (Salazar & Sáenz, 2005).

La farmacoresistencia es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible, lo que tiene como consecuencia el desarrollo de la capacidad para neutralizar el efecto de los medicamentos. La resistencia surge por la mutación del microorganismo o por la adquisición del gen de resistencia (OMS, 2013).

Dentro de los mecanismos de resistencia más relevantes para *Mycobacterium* sp. se encuentra: bacilos multidrogaresistentes (MDR), que son cepas resistentes a los fármacos de primera línea.

Los bacilos extremadamente drogoresistentes (XDR), que son cepas MDR con resistencia a los fármacos de segunda línea (aminoglucósidos, polipéptidos, cicloserinas, tioamidas) y a cualquier fluoroquinolona (Salazar *et al*, 2005).

Según datos epidemiológicos del laboratorio Nacional de Guatemala en el período de 2006 al 2012, fueron reportados 155 casos de pacientes infectados por bacilos MDR y 67 por bacilos XDR.

Debido a lo antes mencionado, se aconseja el uso simultáneo de varios fármacos, elevando así el poder bactericida sobre los bacilos activos, y provocando un efecto esterilizante en bacilos semilatables (García, Lado, Ortiz, Pérez & Túnez, 2003).

5. Profilaxis

- a. Recién nacidos:** Asegúrese que los niños pequeños tengan aplicada la vacuna BCG (Bacilo de Calmette y Guerin) antes de salir de la maternidad (Bossio, Fernández, Fernández, Jure, Nadalich & Ocaña, 2009).

- b. Niños, adultos y personas de la tercera edad:** Consultar inmediatamente un centro de salud, si se presentan síntomas de catarro por más de dos semanas. Así también en caso de ausencia de síntomas consultar y realizar chequeos médicos y exámenes de laboratorio periódicamente (Pérez, 2004).

- c. Situaciones especiales (inmunosupresión/inmunodeficiencia):** En caso de personas con VIH se ha recomendado profilaxis primaria para pacientes con $CD4+ < 200 \text{ mm}^3$ que viven en zonas con alta prevalencia de TB. En otro tipo de enfermedades que comprometan al sistema inmune se recomienda brindar quimioprofilaxis según sea el caso (Pérez, 2004).
- d. Pacientes con infección latente:** Se recomienda proporcionar quimioprofilaxis para evitar la reactivación de la infección. Siempre debe descartarse una infección activa antes de iniciar la terapia, realizando evaluaciones con radiografía de tórax, baciloscopías y cultivo para micobacterias según proceda. (Pérez, 2004).

B. Epidemiología de la tuberculosis

La TB, es una enfermedad causada por el agente *Mycobacterium tuberculosis*, representa una grave amenaza para la salud pública mundial (es la segunda causa de muerte después de sida provocada por un agente infeccioso). A pesar de ser una enfermedad tratable y curable, la TB es responsable de la muerte de dos millones de personas al año, se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, están infectadas por el bacilo pero aún no han desarrollado la enfermedad ni pueden transmitirla (OMS, 2011).

En el año 2010, unos 10 millones de niños quedaron huérfanos a consecuencia de la muerte de los padres por causa de la tuberculosis, y en el año 2011 más de 2000 millones de personas estaban infectadas con el bacilo de la tuberculosis, lo que equivale a un tercio de

la población mundial. Alrededor de 8,7 millones de nuevos casos de tuberculosis en el mundo son diagnosticados (un 13% de estos co-infectados con VIH) y durante el mismo periodo fallecen cerca de 1.4 millones de personas con esta infección, de los cuales medio millón son mujeres (OMS, 2011).

En Guatemala la tuberculosis es un problema de salud pública que a pesar de los avances médicos, sigue en aumento; según datos epidemiológicos de la OMS en el año 2011, existía una mortalidad de 2.4 por 100,000 habitantes; siendo la población más afectada las personas procedentes de los departamentos de Escuintla, Quetzaltenango, San Marcos, Retalhuleu, Guatemala y Suchitepéquez, con una edad comprendida entre los 25 a 39 años de edad, lo cual repercute grandemente a la economía nacional, ya que dicha población se encuentra en edad productiva (OMS, 2011).

Así mismo dentro del Hospital General San Juan de Dios, existe una alta prevalencia de tuberculosis (7.5 por cada 100 muestras procesadas) según datos recabados en el año 2012 (Hospital General San Juan de Dios, 2012).

La OMS en el 2011 estableció que la tasa de mortalidad por tuberculosis disminuyó en un 41% entre 1990 y 2011. Aunque lentamente, está disminuyendo el número anual estimado de personas que enferman de tuberculosis; ello quiere decir que el mundo está en camino de cumplir el “Objetivo de Desarrollo del Milenio”, el cual consiste en detener la propagación de esta enfermedad para el año 2015.

C. Importancia del Área de Tuberculosis y Hongos del Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios.

El Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD) es un centro asistencial de tercer nivel del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social en Guatemala, responsable de brindar atención médica integral, oportuna, eficiente y eficaz a toda la población. El Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH) del laboratorio clínico, ubicado en el primer nivel del HGSJDD está enfocada en investigación, docencia y diagnóstico tanto de micobacterias como de hongos patógenos.

Las técnicas utilizadas en el ATBH para el diagnóstico de tuberculosis son: la baciloscopía, el cultivo en medio sólido (LJ) y el cultivo en medio líquido (MGIT). Sin embargo estas técnicas presentan varias deficiencias, respecto a la baciloscopia posee poca sensibilidad (15-20%), ya que requiere aproximadamente 10^4 bacilos por mililitro de muestra concentrada para la obtención de un resultado positivo (Leao *et al* 2007) y el cultivo tanto en medio líquido como sólido, posee mejor sensibilidad aunque requiere de 2-8 semanas de incubación para evidenciar el crecimiento de micobacterias (Moore *et al*, 2008).

Durante el año 2012, ingresaron al área 826 muestras para diagnóstico de tuberculosis, dentro de las que se pueden mencionar: esputos, lavados bronquiales, aspirados bronquiales, biopsias pulmonares, biopsia de hueso, secreciones, orina, heces, suero, otros líquidos y biopsias. De las cuales 56 muestras fueron diagnosticadas como positivas utilizando la tinción de ZN y 62 por medio de cultivos LJ y MGIT (HGSJDD, 2012).

D. Diagnóstico de Tuberculosis:

1. Examen clínico

Se realiza en base a la sintomatología que presenta el paciente, como: tos productiva, dolores torácicos, astenia, pérdida de peso, fiebre, sudores nocturnos, entre otros (OMS, 2012).

2. Baciloscopía (Tinción de Ziehl-Neelsen/Kinyoun)

Herramienta de evaluación e interpretación microscópica de muestras clínicas, teñidas por medio de la técnica de ZN. La técnica de ZN es una tinción diferencial que utiliza tres reactivos: el colorante primario es la fucsina, que tiene por objetivo la formación de complejos micolatifucsina con los ácidos micólicos presentes en las micobacterias (Leaoet *al*, 2007), luego se aplica calor que sirve de mordiente y estabiliza los complejos antes mencionados. El alcohol ácido al 3% es la solución decolorante que elimina la fucsina excepto la impregnada en los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) y por último el azul de metileno que funciona como contraste, y tiñe el resto de la preparación, facilitando así la evaluación e interpretación diagnóstica (Dorronsoro & Torroba, 2007).

El reporte correspondiente para esta técnica se realiza por medio de cruces (+: 1-10 bacilos, ++: 11-20 bacilos y +++> 20 bacilos por campo); en el caso de pacientes con muestras positivas el número de bacilos es un índice de severidad de la infección; así también es de utilidad para la evaluación sobre la eficacia de los antituberculosos en pacientes con tratamiento previo. En caso contrario solamente se indica la ausencia de BAAR (OMS, 2012).

3. Medios de cultivo

a. Medio sólido Löwenstein Jensen (LJ)

Es el medio de cultivo utilizado de forma rutinaria reconocido por la OMS como método de referencia para el diagnóstico de tuberculosis, ya que posibilita el desarrollo de colonias con morfología característica, a partir de inóculos pequeños.

Este medio se compone de hierro, aminoácidos, sales, glicerina, fécula de papa, huevo y verde de malaquita (encargado de inhibir el crecimiento bacteriano), los medios deben ser incubados a 35°C en la oscuridad con 5-10% de dióxido de carbono (Forbes *et al*, 2002).

Los cultivos deben ser evaluados cada semana. Si existe evidencia de colonias sospechosas de micobacterias, es registrada la velocidad de desarrollo, la pigmentación y la morfología (colonias duras, reseca, color amarillo/beige). Si los cultivos se encuentran contaminados, se descartan indicando la causa y se procede a la solicitud de una nueva muestra (Forbes *et al*, 2002).

Trascurridas las 8 semanas de incubación, sin evidenciar crecimiento, el cultivo debe ser informado como negativo (Forbes *et al*, 2002).

b. Medio Líquido (MGIT)

Es un medio de cultivo utilizado de forma alternativa para el diagnóstico de tuberculosis; dichos medios logran un crecimiento más rápido, con una mayor sensibilidad y especificidad con respecto al medio sólido (Moore *et al*, 2008).

La OMS recomienda incluir siempre un medio de cultivo sólido (estándar de oro), por cada muestra inoculada en medio líquido, en todos los especímenes clínicos que se sospeche contengan *Mycobacterium tuberculosis*.

Este medio contiene caldo Middlebrook 7H9, glicerol, esponjas de celulosa (proporcionan un soporte para el crecimiento de las micobacterias que simulan los alveolos pulmonares) y ácido palmítico marcado con isotopos de carbono (Moore *et al*, 2008). Las bacterias metabolizan los sustratos marcados y liberan CO₂ por encima del caldo contenido en el tubo (Rivera, 2008).

Inmediatamente antes de la inoculación de las muestras se coloca un suplemento a cada frasco con una mezcla de antibióticos (polimixina B, vancomicina, ácido nalidixico, anfotericina B (PANTA), con el objetivo de evitar el crecimiento de cualquier otro microorganismo presente en la muestra (Moore *et al*, 2008).

Los viales son leídos 2-3 veces por semana; las dos primeras semanas y una vez por semana las cinco restantes; en un aparato que perfora el tubo y detecta crecimiento bacteriano en función de la radioactividad (Dorransoro *et al*, 2007). Se consideran positivos los tubos que presenten un índice de radioactividad, superior o igual a 10 (Forbes *et al*, 2002).

Otra de las ventajas y utilidades de este medio es la capacidad de obtener resultados de pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas en un menor tiempo que los métodos comunes y en mayores proporciones (Moore *et al*, 2008).

E. Tinción con fluorocromos Auramina-Rodamina (AR)

1. Generalidades

Esta tinción está basada en un colorante fluorescente, es decir aquel que al incidir con la luz ultravioleta emite luz visible, esta técnica alternativa es poco utilizada y preferentemente recomendada para el diagnóstico de tuberculosis, debido a su alta sensibilidad, especificidad y rapidez (García *et al*, 2004).

En la tinción con fluorocromos, se puede utilizar como primer colorante la auramina, la rodamina o la combinación de ambas. Las tinciones con auramina-rodamina resultan de la unión fisicoquímica entre el colorante primario y la pared micobacteriana, sin ser ensayos basados en una reacción antígeno-anticuerpo (Koneman, 1997), los BAAR se observan fluorescentes de color amarillo a naranja con auramina, rojizos con rodamina y amarillo-rojizos con auramina-rodamina sobre un fondo negro al utilizar permanganato de potasio como colorante de contraste (Hrapchak & Sheuhar, 1980).

Para emplear adecuadamente las tinciones con fluorocromos es necesario ajustar apropiadamente los diferentes componentes del microscopio de fluorescencia con el fin de obtener la transmisión de luz óptima (Brett, Thomas & Truant, 1962).

En los laboratorios grandes como el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD, donde la carga diaria de frotos es grande, se recomienda el uso de la microscopía de fluorescencia (Holst, Mitchison, & Radhakrishna, 1959).

Brett, *et al.* (1962) Resaltó la importancia que para la utilización de dicha técnica se requiere de personal debidamente capacitado que pueda distinguir a los BAAR de artefactos fluorescentes presentes en algunos frotos.

2. Principio

La auramina y rodamina son fluorocromos no específicos que son excitados cuando absorben luz ultravioleta. A medida que las moléculas excitadas regresan a su estado basal, liberan el exceso de energía en forma de luz visible, mostrando así, alta afinidad por los ácidos micólicos de las micobacterias; forman complejos estables resistentes a la decoloración con alcohol ácido. Los microorganismos AAR fluorescen de color naranja-amarillo sobre un fondo negro (Cavallini, Coronado, Chavarria & Hidalgo, 2005).

3. Ventajas

Se puede utilizar un objetivo de menor aumento (40x) para aprovechar el área de la lámina, ya que se observa una mayor cantidad de campos en un menor tiempo (Hrapchak *et al*, 1980).

La identificación de BAAR es bastante evidente, ya que los mismos emiten luz visible al incidir con luz UV (Brett *et al*, 1962). De igual manera dichos microorganismos se encuentran sobre un fondo negro al utilizar permanganato de potasio como colorante de contraste (Hrapchak *et al*, 1980).

La tinción no necesita de proceso de fijación, ya que los ácidos micólicos tienen una gran afinidad por los fluorocromos y no es necesario aplicar un proceso de fijación para que la tinción sea eficaz (García & Silva, 2004).

4. Desventajas

Uno de los principales inconvenientes, es el requerimiento de un microscopio de fluorescencia, así también el contar con personal debidamente capacitado para la identificación correcta de micobacterias. (Holst *et al*, 1959).

5. Usos

Debido a la alta afinidad de los fluorocromos por los ácidos micólicos de la pared celular micobacteriana, se permite diferenciar y confirmar con mayor certeza la presencia y morfología de los BAAR (Negroni, 2009).

Estudios previos han demostrado que puede utilizarse la tinción de AR para el diagnóstico de microorganismos como: *Giardia Lamblia*, *Cryptosporidium* sp, *Cyclospora cayetanensis* y *Blastocystis hominis* (Chávez, 2008).

6. Interferentes

Los principales interferentes inician desde la fase pre-analítica; ya que pueden ser muestras no representativas, poseer un volumen insuficiente, la realización de un frote inadecuado, mala calidad de los colorantes y partículas de objetos que provoquen error de interpretación. (Negroni, 2009).

F. Estudios realizados comparando la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) con Auramina Rodamina (AR).

Ulukanligil, Aslan y Tasci (2000) compararon la sensibilidad de la microscopía de fluorescencia AR con la técnica de ZN para el diagnóstico de TB, utilizando el cultivo de LJ como método de referencia. En pacientes que entregaron una muestra para detección de BAAR, la microscopía por fluorescencia con AR presentó una sensibilidad superior a la tinción de ZN (83% vs. 61%). Lo mismo sucedió en pacientes que brindaron dos muestras, ya que la microscopía por fluorescencia tuvo una sensibilidad del 83% comparada con un 66% de la tinción de ZN. En pacientes que entregaron tres o más muestras, la sensibilidad para la tinción con AR y el ZN fue del 92% y 80% respectivamente.

Lo anterior indica que la sensibilidad de ambas técnicas es similar al contarse con más de dos especímenes y que la fiabilidad de la microscopía por fluorescencia es mayor que la tinción con ZN, debido a que la microscopía por fluorescencia permitió la detección de frotos con baja cantidad de microorganismos. (Ulukanligil *et al.*, 2000)

Se concluye que éste es un método confiable, rápido, de bajo costo que puede ser utilizado en los laboratorios que manejan grandes números de muestras de esputo y cuentan con personal de laboratorio capacitado. (Ulukanligil *et al.*, 2000)

Holst, Mitchison y Radhakrishna (1959) al comparar la microscopía de fluorescencia AR, con la técnica convencional de ZN determinaron que la microscopía por fluorescencia detecta tantos frotos positivos como el ZN. De 1383 esputos evaluados, 655 (47.4%) fueron positivas para cultivo. De las muestras con cultivo positivo, 405 (29.3%) fueron positivas

para ambas tinciones, 36 (2.6%) fueron positivas únicamente por AR y 28 (2.0%) sólo por la técnica de ZN.

Las restantes 186 muestras fueron negativas para ambas técnicas. Asimismo, entre las 699 muestras con cultivo negativo, la microscopía por fluorescencia no tendió a producir un número de falsos positivos, con respecto al número obtenido por ZN (14 muestras). (Holst *et al.*, 1959).

Brett, Thomas y Truant (1962) evaluaron el desempeño de la tinción AR para la detección de BAAR en un estudio que incluyó 3000 especímenes. El 5.6% de las muestras fue positivo tanto para cultivo, ZN y AR, 1.5% fue positivo únicamente para cultivo y AR, 0.5% únicamente para cultivo y ZN y 1.2% solamente por cultivo. De las muestras con cultivo negativo, 2.1% fueron positivas para ambas tinciones, 0.8% fueron positivas únicamente para AR y 0.5% para ZN.

Calvo, García, Pérez, et al. (2011) en un estudio que tenía por objetivo diagnosticar al agente causal de neumonía en pacientes infectados por VIH, evaluaron 61 muestras dentro de las que incluyeron esputos y lavados bronco alveolares; utilizando para dicho fin las tinciones de: ZN, AR, plata metenamina de Gomori y la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), encontrándose como principal agente etiológico a *P. jiroveci* (58%). En ambas muestras la técnica de fluorescencia presentó una mayor sensibilidad (72.2 para esputos y 94.3 para lavados bronco alveolares) que las tinciones restantes.

A pesar de que el número de casos de pacientes con neumonía por micobacterias (12%) fueron pocos, el rendimiento de la tinción AR presentó un excelente desempeño. (Calvo, *et al.*, 2011)

G. Implementación y validación del protocolo Auramina-Rodamina para el diagnóstico microscópico de micobacterias.

La importancia de implementar dicho protocolo, radica en poder diagnosticar de una manera más rápida, sensible y certera a los pacientes infectados con tuberculosis; esto tomando en cuenta la alta sensibilidad y especificidad del cultivo como estándar de oro, así como también el tiempo que el mismo necesita para brindar un diagnóstico conclusivo el cual está comprendido entre 2 a 8 semanas de incubación (Moore, Ponce & Ugarte-Gil, 2008).

Las etapas para llevar a cabo la implementación de un método son las siguientes:

1. Validación del método

El término validación, se utiliza para indicar que el proceso provee evidencia objetiva sobre la capacidad de un método, es decir, para detectar o cuantificar un microorganismo o grupo de microorganismos, basado en características particulares (OAA, 2011).

En un laboratorio clínico, es uno de los principales avales de que el resultado de un proceso es reproducible, cumple con el uso propuesto y está normalizado; de manera que el resultado es comparable al de otro proceso similar también validado que haya sido ejecutado en otro laboratorio de la red, y viceversa (OAA, 2011).

Los métodos no normalizados deben estar apropiadamente validados para poder ser utilizados, ya sean éstos desarrollados por un tercero o resultado de la modificación de un método normalizado. En el caso de modificaciones, es necesario demostrar que éstas no tienen una repercusión sobre la calidad de los resultados (OAG, 2007).

Del mismo modo, los métodos no normalizados como las pruebas comerciales, que no cuenten con datos previos del fabricante; serán sometidos a un proceso para desarrollar parámetros que aseguren la confiabilidad del sistema (OAG, 2007).

Dentro de los parámetros a evaluar para la validación de este método se encuentran: sensibilidad, la cual se define como la proporción de los individuos clasificados como positivos por el estándar de oro, que se identifican correctamente con la prueba en estudio. El valor que puede asumir la sensibilidad varía entre 0 a 1 (100%), es decir, cuanto más alto es el valor, hay una mejor capacidad en la detección de enfermos por la nueva prueba. Una sensibilidad baja produce pérdida de casos que pudieran ser tratados, siendo los mismos fuente de infección para la comunidad. Por todo lo anterior, puede afirmarse que una prueba ideal es aquella que tiene una alta sensibilidad, ya que identifica correctamente una alta proporción de individuos realmente expuestos o enfermos (Alejo & Cuevas, 2010).

Especificidad, esta se define como la proporción de los individuos clasificados como negativos por el estándar de oro, que se identifican correctamente con la prueba en estudio. Al igual que la sensibilidad, el valor de la especificidad varía entre 0 a 1 (100%), lo que significa que cuanto mayor sea el valor, mayor capacidad de detección de sujetos sanos por la prueba. Debido a esto se puede decir que una alta especificidad, brinda pocos resultados positivos en individuos no expuestos o no enfermos (Alejo *et al*, 2010).

Valor predictivo positivo, representa la probabilidad que una persona con resultado positivo en la prueba en estudio tenga la característica de interés. Sin embargo, un resultado positivo no permitirá confirmar el diagnóstico, teniendo entonces un bajo valor predictivo positivo. Con respecto a los valores óptimos esperados hasta el momento no han sido establecidos, sin embargo, se asume que si el valor es menor al 50%, es más probable que realmente no se encuentre la enfermedad presente, lo que significa que entre más alto es el valor, el pronóstico será más valioso (Alejo *et al*, 2010).

Valor predictivo negativo, representa la probabilidad de que una persona con un resultado negativo en la prueba en estudio, no tenga la característica de interés. El valor predictivo de un resultado depende en gran parte de lo común que sea la enfermedad, esto es, cuando la prevalencia es baja; la obtención de un resultado negativo permitirá descartar con mayor seguridad la enfermedad, teniendo entonces un valor predictivo negativo mayor (Alejo *et al*, 2010).

Índice de concordancia Kappa, es la proporción del acuerdo observado que excede la proporción por azar. Si este valor es igual a 1, estaríamos frente a una situación en que la concordancia es perfecta (100% de acuerdo o total acuerdo) y por tanto, la proporción por azar es cero; cuando el valor es 0, hay total desacuerdo y entonces la proporción esperada por azar se hace igual a la proporción observada (Cortéz, Rubio & Gaitán, 2010).

a. Pasos de un proceso de validación

El proceso de validación de un método debe estar cuidadosamente planificado, por ello deben contemplarse los siguientes pasos:

1) Conocer el problema a resolver

Se debe conocer previamente el problema a resolver; así como los recursos necesarios con los que se debe contar para llevar a cabo dicho proceso. Es importante mencionar que los procedimientos y el alcance de la validación no son siempre los mismos; deben ser establecidos de acuerdo a las características del método utilizado y las necesidades del paciente; así como también tener presente las ventajas y desventajas que el nuevo método aporta para el diagnóstico (OAA, 2011).

2) Planificar las acciones a seguir

Esto implica especificar los requisitos y condiciones a cumplir, determinar los parámetros de desempeño del método, establecer el diseño experimental y

el método de análisis de resultados. El diseño experimental y el análisis de resultado tienen que ser estadísticamente válidos (OAA, 2011).

En esta etapa es fundamental definir el alcance de la validación de acuerdo al método a emplear, especificar la matriz o matrices a estudiar; establecer condiciones tales como temperatura, tiempo de incubación, límites de operación etc.; así como realizar una clara descripción del/los microorganismos de interés; y establecer otras limitaciones y especificaciones. Si los parámetros de desempeño no están ya especificados, el laboratorio debe decidir cuáles deben ser caracterizados con el fin de validar el método, lo cual deberá estar fundamentado de manera confiable y científica (OAA, 2011).

3) Llevar a cabo la validación y evaluar los resultados obtenidos

Se deben comparar los parámetros de desempeño y confirmar la validez del procedimiento de acuerdo al propósito establecido y alcance de los objetivos previstos (OPS, 2009).

4) Realizar el Informe de validación

El documento clave de la validación es el protocolo de validación, en base al cual se prepara un informe técnico. Es un plan escrito que establece como debe de realizarse el estudio de validación; así como presentar los resultados obtenidos luego de la realización de dicho proceso (OPS, 2009).

b. Etapas de la Validación

- 1) Calificación de diseño:** Es la evidencia documentada de que las instalaciones, sistemas de apoyo, equipos y procesos hayan sido diseñadas en correspondencia con los requerimientos necesarios (OAA, 2011).

- 2) Calificación de la instalación:** Es la evidencia documentada de que las instalaciones, sistemas de apoyo, equipos y procesos hayan sido construidas e instaladas en correspondencia con sus especificaciones de diseño. Estas especificaciones pueden ser: descripción de equipo y su capacidad de trabajo, información de fabricante, información de mantenimiento, lista de procedimiento de operación, lubricantes, especificaciones del sistema de apoyo crítico, características de los sistemas de control y monitoreo, planos de la instalación y diseño entre otras (OAA, 2011).

- 3) Calificación de la operación:** Es la evidencia documentada de que las instalaciones, sistemas de apoyo, equipos y procesos operen en correspondencia con sus especificaciones de diseño. Demuestra que el sistema, maquinaria y/o equipo involucrado opera correctamente una vez que se ha concluido la calificación de la instalación (OAA, 2011).

4) Calificación del desempeño: Es la evidencia documentada de que un proceso específico produzca consistentemente un producto que reúna sus especificaciones y atributos de calidad predeterminados. Demuestra la efectividad y reproductibilidad del proceso bajo condiciones límites de operación (OAA, 2011).

2. Control de Calidad Interno

Según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), establece que al realizar un proceso de validación, debe de tenerse en cuenta: Las exigencias que el procedimiento requiere, contar con información previa sobre el desempeño del método, y evaluar las características de todos los parámetros de desempeño posible.

Los procesos en un laboratorio de microbiología, son complejos y tienen muchas posibilidades de sufrir variaciones que pueden afectar el diagnóstico final.

La validación de un proceso debe establecerse, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, los rangos de esas variaciones con parámetros como la reproducibilidad, sensibilidad, especificidad, límites de detección o cuantificación. Así mismo debe demostrar que las características de dicho proceso cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados esperados (OPS, 2009).

Para la implementación del protocolo de la tinción AR en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD, se tomaron en cuenta el control de los siguientes parámetros: Tiempos establecidos para la tinción, temperatura de almacenamiento de reactivos

(Desde +15 °C hasta + 25 °C) y combinación adecuada de los filtros de enfoque en el microscopio de fluorescencia.

3. Implementación

La palabra implementar en un laboratorio clínico, expresa la acción de poner en práctica nuevas medidas y métodos diagnósticos, que permitan brindar un mejor desempeño que el anteriormente utilizado, con alternativas distintas que persigan el mismo fin. Es importante mencionar que todo método que se pretenda implementar debe estar previamente validado (OAG, 2007).

4. Capacitación del personal

La norma ISO 15189 en el numeral 5.1.4 inciso g, establece: “asegurar que haya suficiente personal calificado con la capacitación y experiencia adecuadas y documentadas para satisfacer las necesidades del laboratorio”. Lo cual va de la mano con la visión establecida por el laboratorio clínico del HGSJDD que dice: “Brindar servicios eficientes, confiables y oportunos a la población que se atiende en el Hospital General San Juan de Dios aplicando un Sistema de Calidad acreditado basado en la norma COGUANOR NTG/ISO 15189:2007”. Debido a lo antes mencionado es evidente la importancia de la capacitación del personal, luego de la implementación de una técnica nueva.

Las etapas para llevar a cabo un proceso de capacitación son:

a. Primera etapa: Definir las necesidades de formación.

Se definen por escrito las exigencias de competencias, efectuando una revisión de todos los documentos identificando las competencias existentes y requeridas (Zúñiga, 2002).

b. Segunda etapa: Diseño y planificación de la formación.

Se definen los obstáculos existentes en el proceso de formación. Se especifica el plan estableciendo las necesidades de la organización y los objetivos que definen lo que será capaz de hacer el personal luego de la formación (Zúñiga, 2002).

c. Tercera etapa: Suministros para la formación.

Personal capacitado es el proveedor de información, realiza todas las actividades vinculadas al suministro de capacitación, cumpliendo con lo especificado en el plan de trabajo (Zúñiga, 2002).

d. Cuarta etapa: Evaluación de los resultados de la formación del personal.

El objetivo es evaluar si la formación permitió alcanzar los objetivos de la organización. Se colectan los datos y se prepara el informe de evaluación. Los puntos de no conformidad constatados pueden requerir de acciones correctivas preestablecidas (Zúñiga, 2002).

5. Verificación

La verificación se define como la confirmación mediante el examen y la aportación de pruebas objetivas, que indican se han cumplido los requisitos especificados (OAG, 2007).

Aun cuando se haya realizado la validación del método, el laboratorio tendrá que verificar periódicamente que se cumplen los parámetros de desempeño documentados por parte de la organización que lo desarrolló, modificó y/o publicó. Para esta verificación el laboratorio puede utilizar, por ejemplo, muestras inoculadas o materiales de referencia incorporados a las matrices más representativas. También tiene que tomar en cuenta los resultados obtenidos de las auditorías internas y externas de sus sistemas de gestión, dejando registro de las verificaciones (OAG, 2007).

IV. Justificación

Actualmente en Guatemala la tuberculosis es un problema de salud pública que a pesar de los avances médicos sigue en aumento, debido a problemas socioeconómicos, habitacionales y migratorios.

Según datos epidemiológicos de la OMS en el año 2011, existía una mortalidad de 2.4 por cada 100,000 habitantes. Siendo la población más afectada las personas procedentes de departamentos suroccidentales, con una edad comprendida entre los 25 a 39 años (OMS, 2011).

Siendo el control epidemiológico una forma clave para evitar la propagación de la tuberculosis y teniendo en cuenta que los métodos utilizados de forma rutinaria presentan algunas desventajas como por ejemplo: la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) tiene baja sensibilidad (15 a 20%) (Leao *et al*, 2007), y el crecimiento de la micobacteria tanto en medio sólido y líquido tarda alrededor de 2 a 8 semanas para su identificación (Moore *et al*, 2008); es necesario implementar técnicas que permitan realizar dicho diagnóstico con una mejor sensibilidad y rapidez.

La tinción Auramina-Rodamina (AR), utiliza un fluorocromono específico para la pared celular de las micobacterias, permitiendo así alcanzar los objetivos previstos.

En el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD, se utilizan la tinción de ZN, cultivo en medio sólido Löwenstein Jensen (LJ) y líquido MGIT, pero no se cuenta con ningún protocolo para la realización de la tinción AR.

En base a las recomendaciones establecidas en el trabajo de Castellanos en el 2005, se justificó el presente estudio el cual tuvo por objetivo implementar el protocolo ya mencionado, como una técnica de rutina para el diagnóstico microscópico de micobacterias.

Finalmente se evaluó: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice de concordancia kappa para la tinción AR, con respecto a la tinción de ZN y cultivo tanto en medio líquido como sólido (LJ y/o MGIT).

V. Objetivos

A. Objetivo General

Implementar el protocolo de la tinción Auramina-Rodamina (AR) para uso rutinario del diagnóstico microscópico de micobacterias, en el área de tuberculosis y hongos (ATBH) del laboratorio clínico en el Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD).

B. Objetivos Específicos

1. Estandarizar la técnica de AR para la identificación de bacilos ácido alcohol resistentes.
2. Evaluar los diferentes tipos de muestras clínicas de pacientes con diagnóstico presuntivo de TB a través de la tinción AR.
3. Determinar la exactitud de la técnica AR a través de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice de concordancia Kappa.
4. Determinar la fiabilidad de las técnicas AR, ZN y cultivo tanto en medio sólido (LJ) como líquido (MGIT).
5. Implementar el protocolo para la tinción AR por medio de un proceso previo de estandarización, validación y verificación.

VI. Hipótesis

La tinción Auramina-Rodamina (AR) presenta mejor concordancia, sensibilidad, especificidad y valores predictivos con respecto al cultivo, que la tinción tradicional de Ziehl-Neelsen (ZN) para el diagnóstico de micobacterias.

VII. Materiales y métodos

A. Universo de trabajo

Pacientes sospechosos de padecer tuberculosis, que asisten al Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD), a quienes les soliciten pruebas para diagnóstico de tuberculosis.

B. Muestra

Se recolectaron 222 muestras, dentro de las que fueron incluidas: esputos, lavados bronquiales, aspirados bronquiales, biopsias pulmonares, biopsia de hueso, orina, heces y otras secreciones provenientes de pacientes con sospecha de tuberculosis.

- 1. Criterios de inclusión:** Todas las muestras que cumplieran con la fase pre-analítica, que ingresan con solicitud de diagnóstico de tuberculosis (tinción de ZN y cultivo (LJ y/o MGIT).
- 2. Criterios de exclusión:** Todas las muestras que no cumplieran con los criterios de la fase pre-analítica, como muestras con volúmenes insuficientes, muestras no representativas, salivosas y muestras de biopsia de hueso con formalina.

C. Recursos

1. Recursos humanos

a. Estudiantes:

Br. Brenda Graciela Domínguez García

Br. Lilian Lizeth Martínez Morales

Br. Juan Carlos Barrera Toledo

b. Asesores:

Licda. María Luisa García de López

Lic. Cesar Roberto Conde Pereira

c. Personal del ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

2. Recursos institucionales

a. Instalaciones del Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH) del laboratorio clínico, del Hospital General San Juan de Dios (HGSJDD).

3. Recursos físicos

a. Material de Oficina

- 1) Hojas de papel bond blancas
- 2) Lapiceros
- 3) Ganchos
- 4) Computadora marca Compac
- 5) Impresora marca Canon Mp 240

b. Materiales

- 1) Batas desechables
- 2) Guantes de látex
- 3) Mascarilla N95
- 4) Recipientes para recolección de muestras
- 5) Laminas portaobjetos

- 6) Láminas cubreobjetos
- 7) Gradillas
- 8) Recipiente para descarte de muestras
- 9) Pinzas
- 10) Pizeta
- 11) Bandeja porta láminas
- 12) Agua desmineralizada estéril
- 13) Aceite de inmersión

c. Equipo

- 1) Microscopio de fluorescencia
- 2) Cabinas de seguridad biológica nivel 3
- 3) Cronómetro
- 4) Incubadora

d. Reactivos

Fue utilizado un juego de reactivos comercial, el cual esta construido de las siguientes soluciones:

- 1) Solución 1 (Auramina-Rodamina)
- 2) Solución 2 (C_3H_8O y HCl al 37%)
- 3) Solución 3 ($KMnO_4$) o medio de contraste

D. Procedimientos:

1. Recepción de muestras

La recepción de muestras se llevó a cabo por el personal técnico del ATBH

2. Selección y procesamiento de muestras

A cada muestra que cumplía con los criterios de inclusión establecidos, se le realizó el frote para ZN el cual fue procesado por el personal técnico del ATBH y el otro frote para tinción AR fue realizado por los seminaristas. Los frotos fueron observados e interpretados y los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados obtenidos en la interpretación del protocolo a implementar (ver anexo 4).

3. Inoculación en medio sólido/líquido

La inoculación de medios tanto líquidos (MGIT) como sólidos (LJ) fue realizada por el personal técnico del ATBH. La evaluación e interpretación de los cultivos, fue realizada por estudiantes de seminario, para posteriormente utilizar los datos obtenidos y compararlos con los resultados de la interpretación del protocolo a implementar (ver anexo 4)

4. Tinción de Auramina-Rodamina

a. Estandarización:

- 1) Se realizó la tinción con muestras positivas y negativas para *Mycobacterium* sp., utilizando los tiempos y concentraciones que proporcionaron los mejores resultados (ver inciso c).

b. Preparación de láminas portaobjetos:

- 1) Se prepararon láminas de muestras clínicas de la misma manera que se preparan para la tinción rutinaria de ZN.
- 2) Se dejó secar al aire.
- 3) Se fijaron los frotos con ayuda de un mechero, pasándolo de tres a cuatro veces sobre la llama.

c. Tinción AR (Forbes *et al*, 2002).

- 1) Las láminas fueron cubiertas por completo con la solución 1 (Auramina-Rodamina) durante 5 min.
- 2) Seguidamente se lavaron con agua del grifo durante 10 min (con lavados constantes en recipientes adecuados para dicho fin).
- 3) Se agregó la solución 2 (solución decolorante) durante 1 min
- 4) Nuevamente las láminas fueron lavadas con agua del grifo durante 5 min
- 5) Se agregó la solución 3 (solución de contraste) durante 6 min
- 6) Fue realizado el último lavado de las láminas con agua del grifo durante 5 min.
- 7) Finalmente las láminas fueron secadas al aire.

d. Observación e interpretación microscópica

- 1) Los frotos fueron examinados con un microscopio de fluorescencia, utilizando el objetivo 40X.

- 2) Para la observación de las láminas, fue necesario un filtro con un rango comprendido entre 490 a 570nm.
- 3) Los bacilos se observaron de color rojo/naranja con fondo negro.
- 4) Fue utilizado un formato estándar para el reporte y análisis de datos (Ver anexo No. 7)
- 5) Finalmente el frote fue interpretado en base a lo establecido en los parámetros siguientes:

**Interpretación de frotos tenidos con Auramina-Rodamina
(Tinción Fluorescente)**

Número de BAAR observados con tinción fluorescente	Interpretación
0	Negativo
1-2 BAAR/70 campos	Dudoso
2-18 BAAR/50 campos	+
4-36 BAAR/10 campos	++
4-36 BAAR/campo	+++
Más de 36 BAAR/campo	++++

Tomado de: Forbes, B. et al. (2009). *Diagnóstico microbiológico*, 12a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 1160p.

e. Implementación del protocolo “Auramina-Rodamina”

- 1) Luego de estandarizado y validado el método, se procedió a implementarlo. Se recolectaron tanto los materiales como el equipo necesario para realizar adecuadamente dicha técnica.

f. Capacitación del personal

- 1) El personal del ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD fue capacitado por medio de clases magistrales, prácticas de laboratorio laboratorios y muestras desconocidas, con el objetivo de evaluar el manejo, desempeño e interpretación de la técnica.

E. Diseño de Investigación

1. Tipo de estudio

Evaluación de pruebas diagnósticas (Guerrero, 1981)

2. Muestreo

El diseño de muestreo para la presente investigación fue de tipo probabilístico totalmente al azar, en el cual fueron recolectadas 222 muestras en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD, dicho número fue determinado mediante los parámetros correspondientes a la estadística del estudio (ver anexo No. 1).

3. Análisis estadístico

Los resultados fueron almacenados y analizados en una base de datos, elaborada en el programa EpiInfo 6.5. Los indicadores a calcular fueron: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice de concordancia kappa con un 95% de confianza; para cada tipo de muestra seleccionada y comparando las técnicas ZN y AR con el cultivo (método de referencia).

4. Validación de método

Se utilizó la estadística correspondiente al tipo de estudio, calculando la muestra de acuerdo con la prevalencia de muestras confirmadas con el estándar de oro (cultivo), evaluación del desempeño de la tinción Auramina-Rodamina por medio del cálculo de los indicadores de validez, cálculo del índice de concordancia, para establecer si la técnica a implementar cumple con el desempeño y los objetivos previstos (ver anexo No. 1, 2 y 3).

5. Seguimiento de pacientes

Las boletas de todos los pacientes con resultado tanto positivo como negativo, fueron colocados de forma personal en el expediente correspondiente.

6. Elaboración de base de datos

Los datos fueron recolectados utilizando un cuestionario por medio de una entrevista, dicho documento posee tanto datos demográficos como epidemiológicos; los cuales fueron relacionados en forma descriptiva con los resultados obtenidos en la tinción AR y el cultivo (ver anexo No. 6).

VIII. Resultados

A. Tipos de muestras colectadas

Durante el periodo del 29 de julio al 25 de octubre del año 2013, fueron recolectadas 222 muestras, en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD, dichas muestras provinieron de pacientes que se encontraban hospitalizados en los distintos servicios de este nosocomio con posible diagnóstico de TB. Las muestras que con mayor frecuencia fueron enviadas al ATBH corresponden a esputos (144 muestras); seguido de líquidos pleurales (21 muestras) y lavados bronquiales (11 muestras), el resto de muestras se encuentran comprendidas entre un rango de 4 a 6 muestras. (Ver tabla No. 1)

Tabla No. 1: Distribución de los distintos tipos de muestras colectadas (n = 222)

Tipo de Muestra	Número de muestras (n)	%
Aspirado Bronquial	6	2.70
Aspirado Oro traqueal	6	2.70
Biopsia de tejido sólido	4	1.80
Esputo	144	64.90
Lavado Bronquial	11	5.00
Líquido Peritoneal	4	1.80
Líquido Pleural	21	9.50
Medula Ósea	4	1.80
Orina	6	2.70
Secreción de herida	5	2.30
Otros ¹	11	5.00
Total	222	100

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

1: Otros incluyen (Absceso de tejido sólido, aspirado gástrico, aspirado traqueal, lavado gástrico, masa de cuello, líquido de muslo izquierdo, líquido pericardico, mielocultivo)

B. Comparación de técnicas

Las muestras fueron evaluadas para el diagnóstico de TB, a través de cuatro técnicas: tinción de Ziehl Neelsen (19 positivas y 203 negativas), auramina – rodamina (29 positivas y 193 negativas), cultivo en medio sólido Lowenstein Jensen (25 positivas y 135 negativas) y cultivo en medio líquido MGIT (26 positivas y 137 negativas). Fue utilizando como estándar de oro el medio de cultivo LJ; el MGIT se utilizó como apoyo diagnóstico. A través del análisis, se excluyeron 3 muestras de esputo reportadas como contaminadas para el cultivo en medio solido no así para el cultivo en medio líquido (Ver anexo No: 9).

Tras la evaluación de las muestras, se realizó un análisis de exactitud (Sensibilidad, especificidad, VPP, VPN) y concordancia (Índice Kappa) a los datos obtenidos por las distintas técnicas, recabándose los siguientes resultados (Ver tabla No. 2). Es importante mencionar que la prevalencia de TB dentro del ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD calculada en el periodo de presente estudio, fue de 1.3%, tomando en cuenta sus intervalos de confianza al 95% que equivalen a (0.85% – 1.74%) respectivamente.

Tabla No. 2: Exactitud y concordancia de las técnicas de ZN y AR con respecto al cultivo LJ, de todas las muestras recolectadas (n= 219)

Indicador / Técnica	ZN¹ (IC 95%)³	AR² (IC 95%)
Sensibilidad (%)	81.57 (75.00 – 100.00)	91.95 (87.5 – 100.00)
Especificidad (%)	95.71 (87.5 – 100.00)	97.86 (87.5 – 100.00)
VPP ⁴ (%)	94.70 (87.5 – 100.00)	96.46 (87.5 – 100.00)
VPN ⁵ (%)	89.50 (70.02 – 100.00)	95.58 (87.5 – 100.00)
Kappa⁶	0.84 (Optima)	0.93 (Optima)

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

1: ZN = Ziehl Neelsen / 2: AR= Auramina Rodamina / 3: Intervalo de Confianza al 95% / 4: VPP = Valor predictivo positivo / 5: VPN = Valor predictivo negativo / 6: Kappa= Índice de concordancia kappa

La concordancia de los resultados obtenidos por medio de la técnica AR, fue levemente superior a los obtenidos por la técnica de ZN; es importante resaltar que dichos resultados fueron enfocados principalmente en muestras respiratorias, para las cuales sí existían diferencia significativa entre ambas técnicas. Las muestras recolectadas en mayor número fueron los esputos (141 en total); para los cuales se obtuvieron los resultados que se presentan en la siguiente tabla.

Tabla No. 3: Exactitud y concordancia de las técnicas de ZN y AR con respecto al cultivo LJ y MGIT, en muestras de esputo (n= 90)

Indicador / Técnica	ZN¹ (IC 95%)³	AR² (IC 95%)
Sensibilidad (%)	55.55 (47.71 – 88.29)	94.44 (82.06 – 100.00)
Especificidad (%)	100.00 (99.31 – 100.00)	98.63 (99.31 – 100.00)
VPP ⁴ (%)	90.91 (97.06 – 100.00)	94.44 (95.00 – 100.00)
VPN ⁵ (%)	90.00 (82.80 – 97.20)	98.63 (95.28 – 100.00)
Kappa⁶	0.53 (Regular)	0.96 (Optima)

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

1: ZN = Ziehl Neelsen / 2: AR= Auramina Rodamina / 3: Intervalo de Confianza al 95% / 4: VPP = Valor predictivo positivo / 5: VPN = Valor predictivo negativo / 6: Kappa= Índice de concordancia kappa

IX. Discusión de Resultados

El presente estudio, tenía por objetivo, evaluar el desempeño de la tinción fluorescente AR, con respecto a la tinción diferencial de ZN, utilizando como estándar de oro el cultivo LJ y como apoyo diagnóstico el MGIT (utilizados de forma conjunta); para posteriormente implementar dicha técnica como protocolo rutinario en el diagnóstico microscópico de micobacterias en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

En cuanto a la recolección de muestras se refiere , fueron obtenidas en un mayor número las muestras de esputo, esto debido a que la TB pulmonar es la manifestación más frecuente; sin embargo debido a que la enfermedad afecta distintos órganos; puede requerirse la investigación de muestras muy variadas, dentro de las que pueden mencionarse: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, sangre, pus de cavidades abiertas, biopsias, médula ósea entre otras, las cuales deben procesarse bajo el mismo protocolo establecido para las muestras de esputo (OPS, 2008).

Luego de la recolección, se analizaron un total de 185 muestras respiratorias y 34 para el análisis de TB extrapulmonar. Es evidente que el número mayor de muestras respiratorias corresponden a los esputos (Ver tabla No. 1).

Posterior al análisis puede mencionarse que la tinción AR de forma general, presentó una sensibilidad superior a la tinción convencional de ZN con respecto al cultivo (Ver tabla No. 2); logrando comprobarse de esta manera la hipótesis planteada.

La principal forma de diagnóstico a nivel respiratorio es mediante una muestra de esputo (OPS, 2008) por lo que se realizó una comparación entre la tinción de ZN y AR con respecto al cultivo; mediante el análisis de las mismas se encontraron los siguientes resultados (Ver tabla No. 3): Una sensibilidad de 55.55 % para la tinción convencional de ZN versus 94.44% para la tinción con fluorocromos AR; Lo anterior indicó que existe un 38.90 % más en cuanto a probabilidad de clasificar a los individuos como positivos por medio de la tinción fluorescente; los cuales han sido clasificados de igual manera por el estándar de oro (Alejo *et al*, 2010). En lo que respecta a la especificidad se obtuvo 100.00 % y 98.63% para ZN y AR, respectivamente, lo cual indicó que existe una diferencia mínima en cuanto a especificidad que favorece a la tinción diferencial; dicha variación consiste en que la tinción AR por su alta afinidad a los ácidos micólicos posee una mejor sensibilidad; evitando así que pacientes bacilíferos positivos débiles, que aún no manifiestan sintomatología sean diagnosticados como positivos (Negroni, 2009).

En cuanto a los valores predictivos se refiere es importante mencionar que fueron influenciados de forma directa por la prevalencia de TB encontrada en los diferentes tipos de muestra; esto debido a que, sí la prevalencia de una enfermedad es baja, el VPP tiende a disminuir ya que, al haber un mayor número de personas sanas, se incrementa el número de falsos positivos; de igual forma, sí la prevalencia de una enfermedad es muy elevada el VPN tiende a bajar, pues al haber un mayor número de personas enfermas aumenta el número de falsos negativos (Alejo *et al* 2010).

El valor predictivo positivo para ZN y AR respectivamente fueron: 90.91% y 94.44%; dichos valores indicaron que para la prueba de ZN existió una mayor probabilidad de que los pacientes diagnosticados como positivos realmente presenten la enfermedad; esto va de la mano con los resultados observados en la especificidad (Alejo *et al*, 2010). El valor predictivo negativo para AR fue de 98.63% y para ZN de 90.00%, debido a que la tinción fluorescente es más sensible, los valores aquí mencionados indican una mayor probabilidad que los pacientes diagnosticados como negativos; realmente no presenten la enfermedad (Alejo *et al*, 2010). Para las muestras de esputo, el valor de la prevalencia corresponde a: 12.76% con sus respectivos intervalos de confianza: (9.27% – 16.75%), inferior y superior, lo cual indicó que solamente el VPP se encuentra afectado tendiendo así a disminuir.

En el índice de concordancia kappa, se observaron valores de 0.53 para la tinción de ZN y 0.96 para la tinción con AR, los mismos clasificaron las técnicas como regular y óptima, respectivamente; dichos valores muestran que existe una mejor concordancia en los resultados obtenidos utilizando la tinción fluorescente; que sí se utiliza la tinción diferencial (Cortéz, Rubio *et al*, 2010).

Para las muestras de aspirado orotraqueal y aspirado bronquial fueron encontradas diferencias en cuanto al desempeño entre ambas técnicas, por lo cual es necesario discutir su comportamiento; pero dichas variaciones no pueden ser afirmadas con exactitud, ya que el número de especímenes analizados fue muy pequeño, por lo que el sesgo fue alto (Ver anexo No. 11).

El aspirado orotraqueal o esputo inducido, es una muestra recolectada tras un procedimiento invasivo de succión en situaciones especiales donde al paciente le es imposible expectorar, se

utiliza un tubo traqueal con el objetivo de recuperar el material necesario para el diagnóstico de infecciones respiratorias (OPS, 2008). Posterior al análisis de estas muestras (6) se obtuvieron valores de sensibilidad de 50.00% para ZN y 100.00% para AR, lo cual indicó que para este tipo de muestras la tinción fluorescente presentó un 50.00% más de probabilidad de identificar pacientes con infecciones por micobacterias (Aguledo A, Builes L, Hernández M & Robledo J, 2008). Para la especificidad y el VVP no se observó ninguna diferencia ya que los mismos valores reportados como positivos y negativos, fueron diagnosticados utilizando la tinción de ZN, AR y el estándar de oro. El valor predictivo negativo presentó una pequeña variación 66.67 % para ZN, contra un 100.00% para AR, esto debido a que la sensibilidad obtenida para este tipo de muestras en ambas técnicas no fue la misma; la prevalencia encontrada para dichos aspirados fue de: 33.33% con sus respectivos intervalos de confianza: (4.72% – 70.62%), lo cual indicó que solamente el VPN se encuentra afectado tendiendo a disminuir. (Aguledo *et al*, 2008). En cuanto al índice de concordancia Kappa se obtuvo 0.63 para ZN y 1.0 para AR clasificando las mismas como buena y perfecta respectivamente; siendo la tinción fluorescente la que presentó el mejor desempeño (Alejo *et al* 2010).

El aspirado bronquial es una muestra recolectada mediante un proceso invasivo tras la aspiración de material mucopurulento directamente del árbol bronquial (OPS, 2008). Tras el análisis de este tipo de muestra (6), se obtuvieron valores de Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de 75.00% para ZN y 100.00% para AR, esto debido a que durante el análisis de la tinción diferencial fueron determinados un caso falso positivo y uno falso negativo; situación que no sucedió durante el análisis de la tinción fluorescente. Lo anterior indicó que existe un 25% más de probabilidad favorable para el diagnóstico de pacientes con infecciones por micobacterias utilizando la tinción AR. Es importante recordar la influencia de la prevalencia con respecto a los valores predictivos, por lo que dicho dato corresponde a: 50% con sus respectivos intervalos

de confianza (9.99% – 90.00%) (Alejo, *et al*, 2010), lo que indicó que para este tipo de muestras ambos valores predictivos se encuentran afectados, tendiendo a disminuir en igual proporción. Para el índice de concordancia kappa se obtuvieron valores de 0.63 para ZN y 1.0 para AR, lo cual nuevamente comprobó el mejor desempeño y concordancia de la tinción con fluorocromos con respecto al estándar de oro (Aguledo *et al*, 2008).

En las muestras de líquido pleural (21), Orinas (6), Secreciones de herida (5), medula ósea (4), líquido peritoneal (4), lavado bronquial (11), biopsias de tejido sólido (4), entre otras (15), no se observaron diferencias en el desempeño entre ambas técnicas (Ver anexo No. 10).

La palabra implementar en un laboratorio clínico, expresa la acción de poner en práctica nuevas medidas y métodos diagnósticos, que permitan brindar un mejor desempeño que el anteriormente utilizado, con alternativas distintas que persigan el mismo fin. Es importante mencionar que todo método que se pretenda implementar debe estar previamente validado (OAG, 2007) ; por lo que en el presente estudio se procedió de la siguiente manera: Se inició con la recolección de muestras, las cuales fueron analizadas posteriormente; así también con la recolección de datos por medio de una ficha epidemiológica la cual fue de utilidad para la obtención de datos demográficos de cada pacientes y así poder correlacionar los datos obtenidos tras el diagnóstico.

Previo al análisis de las muestras, se realizó una verificación en la metodología; adaptando de esta manera la tinción con las muestras a evaluar. En base a dicha información se estableció la factibilidad y calidad de la técnica para el análisis posterior de las mismas (OAA, 2011). Por lo que se evaluaron los tiempos establecidos por el fabricante del reactivo (en cada una de las etapas); determinándose la necesidad de aumentar un minuto en la etapa final; la solución de

contraste está constituida de KMnO_4 (permanganato de potasio); el cual se reduce a Mn^{2+} , siendo incoloro en soluciones ácidas (Ayres, 1986). El reactivo decolorante utilizado en la etapa anterior, está constituido de $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ (Propanol) y HCl al 37%, por lo que dichos remanentes afectan el pH en esta etapa. Finalmente se estableció que para la obtención de mejores resultados eran necesarios seis minutos.

La OPS establece, que al realizar un proceso de validación, debe de tenerse en cuenta el desempeño del método, así como evaluar las características de todos los parámetros posibles, con el fin de contar con un control de calidad adecuado que garantice la veracidad de los resultados en el trabajo realizado. Para el control de calidad del presente estudio, se prepararon muestras control, constituidas de 4 láminas con controles negativos (1 lámina de esputo con BK negativo, 1 lámina con *E. coli*, 1 láminas con *C.albicans* y 1 láminas con *S. pyogenes*), esto con el fin de evidenciar la ausencia de fluorescencia en los microorganismos, debido a que no poseen ácidos micólicos en la pared celular. De igual manera fueron realizados 4 controles positivos; para lo cual se utilizaron muestras de esputos con cultivo positivo y que durante la evaluación con la tinción de ZN presentaron los resultados siguientes: 8 BAAR por campo (Control Débil), + (Control Bajo), ++ (Control medio), +++ (Control alto), para las cuales se obtuvieron resultados congruentes con AR.

Tras el análisis de cada una de las muestras, se realizó una capacitación al personal del ATBH, esto según lo establecido por la norma ISO 15189 en el numeral 5.1.4 inciso g, que establece: “asegurar que haya suficiente personal calificado con la capacitación y experiencia adecuadas y documentadas para satisfacer las necesidades del laboratorio”; dicha capacitación consistió en una clase magistral, seguido de un laboratorio practico en el cual se realizó el

protocolo de la tinción e interpretación de las láminas (muestras control y muestras de evaluación).

Para finalizar con la implementación de dicho protocolo, fueron establecidos como actividades rutinarias la elaboración de las entrevistas (ficha epidemiológica), así como el uso de material necesario en el área para realizar la tinción (frascos, gradillas, pipetas, guías etc.). En cuanto al microscopio de fluorescencia el mismo se encuentra dentro del área de inmunología, el cual es utilizado paralelamente para la observación de muestras de influenza, por lo que el tiempo (horas durante el día) y espacio para la observación de las láminas con AR, igualmente fue establecido para evitar inconvenientes. La verificación del protocolo se realizó posterior a la capacitación; se introdujo la tinción en el diagnóstico rutinario de las muestras a evaluar durante el día; evidenciando ningún inconveniente para el procesamiento de las mismas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en cuanto a sensibilidad para ZN y AR (81.57% vs 91.95%), son comparables con los resultados obtenidos en estudios realizados previamente; dentro de los que pueden mencionarse los reportados por: La CIB (96.50% vs 82.00% para KY), Astudillo y colaboradores (43.30% vs. 46.70%) y Holst, Mitchison y Radhakrishna (29.30% y 47.40%).

La mayor limitación de la presente investigación fue la poca disponibilidad de la información en los diferentes servicios del HGSJDD durante la realización de las entrevistas y el principal aporte fue implementar una prueba más sensible y específica en el diagnóstico rápido de TB, en un centro hospitalario de tercer nivel, el cual es encargado de prestar atención médica a una gran parte de la población guatemalteca.

X. Conclusiones

- A. La tinción Auramina Rodamina (AR) fue estandarizada, luego de verificar el procedimiento establecido por el fabricante del reactivo, demostrándose que era necesario un minuto más en la etapa de contraste.

- B. Tras el análisis de las muestras los mejores resultados en cuanto a desempeño, fueron obtenidos para esputos, aspirados bronquiales y aspirados orotraqueales.

- C. De forma general la tinción AR presento un desempeño superior con respecto a la tinción de ZN (81.57% vs 91.95%), utilizando como estándar de oro el cultivo LJ y/o MGIT.

- D. El protocolo para la tinción AR, fue implementado luego de la capacitación del personal de dicho lugar; evaluando y verificando el funcionamiento del mismo al ser utilizado como parte de las técnicas diagnósticas de uso rutinario en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

XI. Recomendaciones

- A. Gestionar fondos para la adquisición de un microscopio de fluorescencia propio para el ATBH, con el cual se tendrá acceso a cualquier momento para la evaluación de las láminas teñidas con AR.

- B. Evaluación constante por parte del encargado del ATBH, acerca de la utilización correcta de la nueva técnica implementada, con el objetivo de verificar el uso adecuado de la misma.

- C. Capacitar constantemente al personal que rota por el ATBH, así como a los estudiantes que realizan el Ejercicio Profesional Supervisado (EPS).

- D. Realizar un análisis similar específicamente para muestras de aspirados orotraqueales y aspirados bronquiales, debido a que las muestras analizadas en el presente estudio, fueron muy pocas.

XII. Referencias

- Agudelo, C., Builes, L., Hernández, M., Robledo, J. (2008). Nuevos métodos para el diagnóstico de la tuberculosis. *Redalyc*, 21(3), 321-332.
- Alejo, A. & Cuevas, C. (2010). *Sensibilidad y especificidad de una prueba*. Validez y fiabilidad de las medidas de exposición y medición. Facultad de Psicología: México.
- American Thoracic Society.(2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases.*Am Rev Respir Dis*, 161, 123:1376-1395.
- Armstrong, D.,Raffalli, J., Riley, L., Sepkowitz, k. (1995). Tuberculosis in the AIDS Era.*ClinMicrobiol Rev*, 5(2), 180-199.
- Aslan, G., Tasci, S. &Ulukanligil, M. (2000).A Comparative Study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli.*MemInstOswaldo Cruz*. 95(8), 55-858.
- Astudillo, M., Bustamante, J., Bravo, E. & Pazos, J. (2010). Detección de Bacilos ácido alcohol resistentes en biopsias embebidas en parafina en casos de inflamación granulomatosa crónica. *Acta biolColomb*, 15(2), 263-270.
- Ayres, G. H. (1986). *Analisis Quimico Cuantitativo*. Madrid, España: Harper & Row Publishers .

- Barrón, H. Monteghirfo, M. & Rivera, N. (2006). Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. *AnFacMed Lima*, 67(1), 11-18.
- Boldu, J., Cegollero De Prado, A. P. Abu, J. (2007). Tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *An. sist. SanitNavar*, 30(2), 99-115.
- Bossio, J., Fernández, C., Fernández, H., Jure, H.,Nadalich, J. & Ocaña, M. (2009). Enfermedades infecciosas, Tuberculosis. (Guía para el equipo de salud). Argentina: Ministerio de Salud
- Brett, W., Thomas, W. & Truant J. (1962). Fluorescence Microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull*, 10, 287-296.
- Cascante, J., Eguía, V., Hueto, J., Pascal, I. (2007). Diagnóstico de la infección tuberculosa. *An. Sist. Sanit. Navar*, 30(2), 49-65
- Castellanos, M. E. (2005). *Evaluación de dos técnicas alternativas para el diagnóstico de tuberculosis*. (Tesis de graduación para optar al título de Química Biológica). Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Cavallini, E., Coronado, M., Chavarria, F., Hidalgo, J. (2005). *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica.

Cercenado, E., Cantón, R., (2005). *Procedimientos de Microbiología Clínica*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España: SEIMC.

Cortéz Reyes, E., Rubio Romero, J. A., & Gaitán Duarte, H. (2010). Métodos Estadísticos de evaluación de la concordancia y reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 9.

Chávez, E. (2008). Diagnóstico de protozoarios intestinales frecuentes en niños. *RevSoc Bol Ped*, 47(3), 169-77.

Dorronsoro, I., Torroba, L. (2007). Microbiología de la tuberculosis. *AnSistSanitNavar*, 30(2) 67-85.

Drobniewski, F., Pozniak, A., Uttley, A. (1995). Tuberculosis and AIDS *J. Med Microbiol*, 43, 85-91.

Forbes, B., Sahm, D. &Wessfeld A. (2002). *Bailey &Scott'sDiagnosticMicrobiology*. Estados Unidos: Mosby, Inc.

García, J. (2010). *Situación epidemiológica de la Tuberculosis en Guatemala*. Centro nacional de epidemiología. Documento recuperado de

<http://epidemiologia.mspas.gob.gt/vigepi/2010/SIDA/TB%20taller%2027agosto2010.pdf>

García, M & Silva, M. (2004). *Manual del Técnico superior de laboratorio de análisis clínico*. Madrid España: Editorial MAD SL.

García, R. Lado, F., Ortiz, A., Pérez, M., Túnez, V., (2003). Tratamiento actual de tuberculosis. *Anales de Medicina Interna*, 2(20), 91-100.

Girón, M. R., Maíz, L., Barrios, I., et al. (2008). Estudio multicéntrico de prevalencia de micobacterias ambientales en pacientes con fibrosis quística. Servicio de Neumología. Madrid España: Hospital de la Princesa. *ArchBronconeumol*, 44(12). 679-84.

Gordis, L. (2005). *Epidemiología*. España: Elsevier, S.A.

Guerrero, M. (1981). *Epidemiología*. Colombia: Fondo educativo interamericano.

Havlr, D.V., Barnes, P. (1999). Current Concepts. Tuberculosis in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *N Engl J Med*, 340, 367-373.

Hrapchak BB.&Sheuhar DC.(1980). *Theory and Practice of Histotechnology*. Estados Unidos: The C.V. Mosby Company.

Holst, E., Mitchison, D. & Radhakrishna. (1959). Examination of smears for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Ind J Med Res.* 47, 495-499.

Hospital General San Juan De Dios. (2012). *Estadísticas del área de Micobacterias y hongos*. Estadísticas aun no publicadas utilizadas para realizar proyecto de investigación.

Instituto Nacional de salud. (2007). *Evento de vigilancia Tuberculosis*. INS-subdirección de vigilancia y control. Recuperado de: <http://www.dadiscartagena.gov.co/web/images/docs/saludpublica/tuberculosis-f.pdf>

Koneman, E. W. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Estados Unidos: Lippincott-Raven Publishers.

Larrea, R., Roque, M. (2007). Enfermedades oportunistas. Experiencia en la población con SIDA. *Revista cubana médica.* 46(3).

Leao, S., Palomino, J., Ritacco, V. (2007). *From basic science to patient care*. Tuberculosis 200.

Ministerio de Salud Pública y asistencia social. (2009). Módulo introductorio: *La tuberculosis como problema de salud pública*. Programa nacional de Tuberculosis/DRPAP. Recuperado de http://www.misanjuandedios.org/files/Modulo_introductorio.pdf

Ministerio de salud. (2009). *Enfermedades Infecciosas: Tuberculosis, Guía para el Equipo de salud*. Dirección de Epidemiología, Ministerio de salud de la nación República de Argentina.

Moore, D. A, C., Ponce, M. & Ugarte-Gil. (2008). Pruebas de sensibilidad para *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Med*, 25(3), 171-175

Murray, P. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. Estados Unidos: ASM Press.

Negrón, M. (2009). *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Editorial Médica Panamericana.

Oficina de Acreditación, Guatemala, C.A. . (2007). *Políticas de Selección y Validación de métodos de ensayo* . Guatemala : OGA-GEC-016.

Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis*. Normas y guía técnica. Recuperado de <http://files.sld.cu/tuberculosis/files/2009/12/tb-labs-baciloscopia1.pdf>

Organismo Argentino de Acreditación. (2011). *Guía para la validación de métodos microbiológicos*. OAA. Versión 1.

Organización Mundial Para la Salud. (2012). *Informe mundial sobre la tuberculosis 2012*. Sinopsis. Recuperado de http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr12_executivesummary_es..pdf

Organización Mundial Para la Salud. (2012). *Que es la tuberculosis y como se transmite.*

Recuperado de: <http://www.who.int/features/qa/08/es/index.html>

Organización Mundial de la Salud. (2012). *Tuberculosis*, N0. 104. Recuperado de

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>

Organización Panamericana de la Salud. (2009). *Curso de Gestión de calidad y buenas prácticas de laboratorio.*

Organización Panamericana de la Salud. (s.f.). *Métodos de Investigación Epidemiológica en Enfermedades Transmisibles.* Venezuela, Doc. Tec.

Pérez, C. (2004). Profilaxis antimicrobiana: Tuberculosis. *RevChilInfect*, 21(1), 28-30.

Pérez, C. C., García, C. P., Calvo, A. M., et al. (2011). Etiología de la neumonía en pacientes chilenos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Universidad Austral de Chile*.28(4). 343-348.

Rivera, O. (2008, 22 de enero). *Diagnóstico de la tuberculosis por el laboratorio de microbiología.* Grupo de investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Universidad del Cauca. Recuperado de: <http://facultadsalud.unicauca.edu.co/Revista/%5CPDF%5C2008%5C100103200805.pdf>

Salazar, A., Sáenz, D. (2005). *Tratamiento de la tuberculosis*. Documento para discusión con expertos locales de acuerdo al plan general para guías clínicas de tratamiento “Plan general”. Departamento de farmacoloepidemiología del seguro social de Costa Rica. Recuperado de:http://www.cochrane.ihcai.org/programa_seguridad_paciente_costa_rica/pdfs/25_Tratamiento-de-la-Tuberculosis.pdf

Sepkowitz, K., et al. (1995). Tuberculosis in the AIDS Era. *ClinMicrobiol Rev*, 5, 180-199.

Ulukanligil, M., Aslan, G. &Tasci, S. (2000). Comparative Study on the Different Staining Methods and Number of Specimens for the Detection of Acid Fast Bacilli. *MemInstOswaldo Cruz*, 95(6), 855-858.

World Health organization.(2012). *Tuberculosis* profile.Guatemala. Recuperado de:https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO_HQ_Reports/G2/P ROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=GT&outtype=html

Zuñiga, F. (2002). *La gestión de la calidad en la formación profesional*. INTECAP: Guatemala.

XIII. Anexos

Anexo No. 1 Calculo de la muestra (n)

Debe de tenerse en cuenta los siguientes parámetros:

- El número de muestras a evaluar debe establecerse en base a la prevalencia esperada (muestras confirmadas con cultivo).
- Utilizar un nivel de confianza al 95%
- Utilizar un límite de error igual al 4%

La fórmula para el cálculo de muestras a evaluar es:

$$n = (NC^2 * \sigma^2) / \Delta^2$$

- $NC = \text{Nivel de confianza (95\%)} = 1.96$
- $\sigma^2 = p*q = (\text{prevalencia} * \text{complemento})$
- $\Delta = \text{Límite de error} = 0.04$

Cálculo:

$$n = (1.96^2 * 0.26^2) / (0.04)^2 = \mathbf{162 \text{ muestras}}$$

Anexo No. 2
Cálculo de indicadores para la evaluación del desempeño de la tinción “Auramina-Rodamina”

1) Modelo de referencia:

	Positivo	Negativo
Positivo	Verdadero positivo (a)	Falso positivo (b)
Negativo	Falso negativo (c)	Verdadero negativo (d)

Indicadores de validez del protocolo de la tinción de Auramina-Rodamina

Indicador	Fórmula	Observaciones
Sensibilidad	$a / (a + c)$	Se calculará al comparar la tinción de AR y ZN con cultivo
Especificidad	$d / (b + d)$	Se calculará al comparar la tinción de AR y ZN con cultivo
Valor predictivo positivo	$a / (a + b)$	Se calculará al comparar la tinción de AR con el cultivo
Valor predictivo negativo	$d / (c + d)$	Se calculará al comparar la tinción de AR con el cultivo

Tomado de: Gordis, L. (2005). *Epidemiología*. 2era. Edición, Elsevier España, S.A. pp 71-92.

*N= Número total de casos

Anexo No. 3
Índice de concordancia kappa (k)

Modelo de referencia

Método No. 1					
		Si	No		
Método No. 2	Si	A	B	N1	
	No	C	D	N2	
		N3	N4	Total	

$$k = 2 (AD + BC) / (N1*N4 + N2*N3)$$

Interpretación de índice de concordancia kappa (k)

Kappa	Concordancia
<0.4	Pobre
0.4-0.6	Regular
0.6-0.8	Buena
0.81-0.90	Optima
1.00	Perfecta

Tomado de: Gordis, L. (2005). *Epidemiología*. 2era. Edición, Elsevier España, S.A. pp 71-92.

Anexo No. 4
Procedimiento Operativo Estándar para tinción de Auramina Rodamina

 HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS <small>Guatemala, Centroamérica</small>	 LABORATORIO CLÍNICO	Tinción de Auramina Rodamina-AR-	 UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA <small>INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS</small>	
Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH)			Fecha: 6/7/2013	POE No. 1 Pág. 1/ 3

OBJETIVO	Identificación de bacilos alcohol ácido resistentes para el aporte al diagnóstico de tuberculosis
ALCANCE	El siguiente procedimiento establece los lineamientos para la elaboración de los procesos de tinción de AR.
RESPONSABLE	Jefatura del laboratorio: verificar y velar por el cumplimiento de los procedimientos. Personal técnico que trabaja en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD. Llevar a cabo todos los pasos del procedimiento descrito.
DESCRIPCION	Herramienta de evaluación e interpretación microscópica de muestras clínicas, teñidas por medio de la técnica de Auramina rodamina. Tinción diferencial constituida de tres reactivos.
PROCEDIMIENTO	Materiales <ul style="list-style-type: none"> • Lámina Portaobjetos. • Fósforos. • Algodón. • Pinzas. • Alcohol al 70% • Colorante Auramina rodamina • Solución decolorante. • H2O de chorro. • Colorante de contraste • Bandeja y porta laminas.

Realizado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Brenda Domínguez Lilian Martínez Juan Carlos Barrera	Lic. Cesar Roberto Conde Licda. María Luisa García de López	Dra. Blanca Samayoa
Fecha: 6/07/13	Fecha: 06/05/14	Fecha: 07/07/14

		Tinción de Auramina Rodamina-AR-		
Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH)			Fecha: 6/7/2013	POE No. 1 Pág. 2/3

	<p>Procedimiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar un extendido de la muestra en una lámina portaobjetos. 2. Fijar la lámina en calor por 10 segundos con una bolita de algodón con alcohol. 3. Teñir y cubrir con el colorante Auramina por 15 min. 4. Lavar con agua de chorro por 10 min. 5. Cubrir con solución decolorante por 1 minutos y lavar con agua de chorro por 5 min. 6. Cubrir la lámina con colorante de contraste por 5 min y lavar con agua de chorro por 5 min. 7. Dejar secar y observar con objetivo 40x. 8. Reportar resultados en libro de trabajo y boleta correspondiente. <p>Observación e interpretación microscópica</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Examinar el frote en un microscopio de fluorescencia, utilizando el objetivo 40X. 2. Utilizar para la observación e interpretación, de las láminas, un filtro con un rango comprendido entre 490 a 570 nm 3. La interpretación para la observación de los bacilos es la siguiente: 4. Los bacilos se observarán de color amarillo/rojizo con fondo negro. Será utilizado un formato estándar para el reporte y análisis de datos
--	--

Realizado por: Brenda Domínguez Lilian Martínez Juan Carlos Barrera	Revisado por: Lic. Cesar Roberto Conde Licda. María Luisa García de López	Aprobado por: Dra. Blanca Samayoa
Fecha: 6/07/13	Fecha: 06/05/14	Fecha: 07/07/14

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	Tinción de Auramina Rodamina-AR-		
Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH)			Fecha: 6/7/2013	POE No. 1 Pág. 3/3

ANEXOS	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <th colspan="2" style="text-align: center;">Interpretación de frotis tenidos con Auramina-Rodamina (Tinción Fluorescente)</th> </tr> <tr> <th style="text-align: center;">fluorescente</th> <th style="text-align: center;">Interpretación</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">Negativo</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">1-2 BAAR/70 campos</td> <td style="text-align: center;">Dudoso</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">2-18 BAAR/50 campos</td> <td style="text-align: center;">+</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4-36 BAAR/10 campos</td> <td style="text-align: center;">++</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4-36 BAAR/campo</td> <td style="text-align: center;">+++</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Más de 36 BAAR/campo</td> <td style="text-align: center;">++++</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;"> <small>Tomado de: Forbes, B. et al. (2009). <i>Diagnostico microbiológico</i>, 12a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 1160p.</small> </td> </tr> </table>	Interpretación de frotis tenidos con Auramina-Rodamina (Tinción Fluorescente)		fluorescente	Interpretación	0	Negativo	1-2 BAAR/70 campos	Dudoso	2-18 BAAR/50 campos	+	4-36 BAAR/10 campos	++	4-36 BAAR/campo	+++	Más de 36 BAAR/campo	++++	<small>Tomado de: Forbes, B. et al. (2009). <i>Diagnostico microbiológico</i>, 12a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 1160p.</small>	
	Interpretación de frotis tenidos con Auramina-Rodamina (Tinción Fluorescente)																		
fluorescente	Interpretación																		
0	Negativo																		
1-2 BAAR/70 campos	Dudoso																		
2-18 BAAR/50 campos	+																		
4-36 BAAR/10 campos	++																		
4-36 BAAR/campo	+++																		
Más de 36 BAAR/campo	++++																		
<small>Tomado de: Forbes, B. et al. (2009). <i>Diagnostico microbiológico</i>, 12a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 1160p.</small>																			
REFERENCIAS	Tomado de: Forbes, B. et al. (2009). <i>Diagnóstico microbiológico</i> , 12a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana. 1160p.																		

Realizado por: Brenda Domínguez Lilian Martínez Juan Carlos Barrera	Revisado por: Lic. Cesar Roberto Conde Licda. María Luisa García de López	Aprobado por: Dra. Blanca Samayoa
Fecha: 6/07/13	Fecha: 06/05/14	Fecha: 07/07/14

Anexo No. 5
Procedimiento Operativo Estándar para Inoculación en medio sólido Lowenstein
Jensen (LJ)

 HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS <small>Guatemala, Centroamérica</small>	 LABORATORIO CLÍNICO	Inoculación en medio sólido Lowenstein Jensen (LJ)	 UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	
Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH)			Fecha: 6/7/2013	POE No. 2 Pág. 1/2

OBJETIVO	Aislamiento de colonias con morfología característica de micobacterias a partir de inóculos pequeños.
ALCANCE	El siguiente procedimiento establece los lineamientos para la elaboración de los procesos para la inoculación de muestras en medio sólido LJ.
RESPONSABLE	Jefatura del laboratorio: verificar y velar por el cumplimiento de los procedimientos. Personal técnico que trabaja en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.
DESCRIPCION	Medio de cultivo utilizado de forma rutinaria reconocido por la OMS como método de referencia para el diagnóstico de tuberculosis
PROCEDIMIENTO	<p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pipetas Pasteur estériles. • Medios LJ. • Gradillas. • Incubadora. <p>Procedimiento</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Aspirar con una pipeta Pasteur estéril el contenido de fondo cónico del tubo su respectiva muestra. 2. Colocar 2 a 4 gotas de la muestra descontaminada (cuando sea necesario), en un tubo de medio L J, previamente identificado permitiendo que la muestra se distribuya en el slant del medio; 3. Dejar reposar en posición horizontal por 24 horas y colocar el tubo en posición vertical en una gradilla. 4. Incubar por 8 semanas a 37°C. 5. Evaluar los medios de cultivo cada semana. 6. Interpretación: colonias duras, resacas, color amarillo/beige.

Realizado por: Brenda Domínguez Lilian Martínez Juan Carlos Barrera	Revisado por: Lic. Cesar Roberto Conde Licda. María Luisa García de López	Aprobado por: Dra. Blanca Samayoa
Fecha: 6/07/13	Fecha: 06/05/14	Fecha: 07/07/14

 <p>HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS Guatemala, Centroamérica</p>	 <p>LABORATORIO CLÍNICO</p>	Inoculación en medio sólido Lowenstein Jensen (LJ)		
Área de Tuberculosis y Hongos (ATBH)		Fecha: 6/7/2013	POE No. 2 Pág. 2/2	

ANEXO	No aplica para este Procedimiento.
REFERENCIAS	Modificación para el año 2004 del Manual diagnóstico de micobacterias. Laboratorio de Tuberculosis, HGSD. (Traducción libre del ASM clinicalMicrobiologyProceduresHandbook (1998), con modificaciones y para fines docentes). Guatemala, Doc. Tec. 2000.

Realizado por: Brenda Domínguez Lilian Martínez Juan Carlos Barrera	Revisado por: Lic. Cesar Roberto Conde Licda. María Luisa García de López	Aprobado por: Dra. Blanca Samayoa
Fecha: 6/07/13	Fecha: 06/05/14	Fecha: 07/07/14

Anexo No. 6
Ficha Epidemiológica

 HOSPITAL GENERAL SAN JUAN DE DIOS <small>Guatemala, Centroamérica</small>	 LABORATORIO CLÍNICO	Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Hospital General San Juan de Dios Área de Tuberculosis y Hongos	 UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA	 GUATEMALA
Ficha Epidemiológica		Diseño e implementación del protocolo de la tinción de Auramina-Rodamina para uso rutinario del diagnóstico microscópico de micobacterias.	Fecha: 6/7/2013	Documento No. 1

I. DATOS DEMOGRÁFICOS

Fecha	<input type="text"/>	Id. De Paciente	<input type="text"/>	Estancia en (días)	<input type="text"/>						
1. Género	M <input type="checkbox"/>	F <input type="checkbox"/>	Usuario	Ambulatorio <input type="checkbox"/>	Hospitalizado <input type="checkbox"/>	Servicio	<input type="text"/>				
2. Nombre	<input type="text"/>					<input type="text"/>					
3. Fecha de nacimiento	<input type="text"/>	4. Edad (años)	<input type="text"/>	5. Fecha de defunción	<input type="text"/>	6. Ocupación					
7. Dirección	<input type="text"/>										
8. Teléfono	<input type="text"/>			Teléfono 2	<input type="text"/>						
9. Etnia	Ladino <input type="checkbox"/>	Maya <input type="checkbox"/>	Garífuna <input type="checkbox"/>	Otro <input type="checkbox"/>	10. Escolaridad	Iria. <input type="checkbox"/>	2ria/ Carrera. <input type="checkbox"/>	Universidad <input type="checkbox"/>	No estudio <input type="checkbox"/>		
11. Estado civil	soltero <input type="checkbox"/>	casado <input type="checkbox"/>	Viudo/divorciado <input type="checkbox"/>	Unido <input type="checkbox"/>	12. Hijos	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Cuántos	<input type="text"/>		

II. FACTORES ASOCIADOS

1. Diagnóstico de tuberculosis con anterioridad	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	2. Tratamiento previo contra TB	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Desconocido <input type="checkbox"/>					
3. Asiste a CFLAG	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Desconocido	4. Familiares con TB	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Desconocido	<input type="text"/>			
5. Estancia en la cárcel	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	6. ¿Cuál cárcel?	<input type="text"/>							
7. Número de personas que comparten casa	<input type="text"/>	8. Investigación de TB en familiares	Si <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	Desconocido	<input type="text"/>					

III. DATOS DE LABORATORIO (LLENADO EXCLUSIVO DEL LABORATORIO CLÍNICO)

1. No. De Ingreso	<input type="text"/>	2.BK	<input type="text"/>	3.Auramina-Rodamina	<input type="text"/>	4.Tipo de muestra	<input type="text"/>
5.Cultivo LJ	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>	Contaminado <input type="checkbox"/>	6.ID Especie	<input type="text"/>		
7.Cultivo MGIT	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>	Contaminado <input type="checkbox"/>	8.ID Especie	<input type="text"/>		
9.Susceptibilidad	Isoniacida <input type="checkbox"/>	Rifampicina <input type="checkbox"/>	Estreptomicina <input type="checkbox"/>	Etambutol <input type="text"/>		Otro <input type="text"/>	
10.Interpretación susceptibilidad	<input type="checkbox"/>	11. PCR TB	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="text"/>	<input type="text"/>	Indeterminado <input type="text"/>	

Anexo No. 8 Datos Demográficos

A continuación se presentan los datos demográficos (obtenidos a través de una ficha epidemiológica), de los pacientes hospitalizados quienes por su historial clínico y sintomatología, fueron diagnosticados presuntivamente con TB.

Los departamentos con mayor número de posibles casos de TB son: Guatemala con 69 casos, Jutiapa y Jalapa con 5 y el resto de departamentos oscilan en un rango comprendido entre 1 a 3 casos; predominando como posibles portadores pacientes de sexo femenino con 59 casos, con respecto al sexo masculino con 56 casos.

Tabla No. 2: Datos demográficos de pacientes hospitalizados (N= 115)

Lugar de Procedencia/ servicio	Servicio 1 ¹		Servicio 2 ²		Servicio 3 ³		Servicio 4 ⁴		Servicio 5 ⁵		Servicio 6 ⁶		Servicio 7 ⁷	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Zona Central	6	3	4	5	3	3	0	4	8	1	5	4	16	14
Zona Norte	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5	3
Zona Sur	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
Zona Este	1	0	3	1	1	1	0	0	0	3	0	0	2	2
Zona Oeste	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	1	0	1	5
Total	7	4	7	8	5	5	0	4	8	5	6	4	26	26

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

Zona central: Guatemala, El Progreso, Sacatepequez, Chimaltenango, Antigua Guatemala

Zona norte: Quiche, Baja Verapaz, Alta verapaz, Peten, Izabal

Zona sur: Escuintla, Santa Rosa

Zona este: Zacapa, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa

Zona oeste: Solola, Totonicapan, Quetzaltenango, Suchitepequez, Mazatenango, Retalhuleu, San Marcos, Huehuetenango.

1: Servicio 1: CM, CAAP, COEX, CAAPP

2: Servicio 2: CP, CUNAS, EMA, EP

3: Servicio 3: MN, NE, NEFROLOGIA

4: Servicio 4: NEURO CC17, NEURO QUIRURGICA, NUTRI, PEDIA

5: Servicio 5: OBS-EMA, OBS-PEDIA, SEPTICO, SHOCK

6: Servicio 6: UCIM, UCIP, UROLOGIA

7: Servicio 7: VIII, XIIB, XIII A, XIIB, XIVA, XIVB, XVA, XVIA, XVIB, XVII A, XVII B

Anexo No. 9
Resultados de ensayos diagnósticos

Las muestras fueron evaluadas a través de cuatro técnicas: tinción de Ziehl Neelsen (19 positivas y 203 negativas), Auramina – Rodamina (29 positivas y 193 negativas), cultivo en medio sólido Lowenstein Jensen (25 positivas y 135 negativas) y cultivo en medio líquido MGIT (26 positivas y 137 negativas), a través del análisis, fueron excluidas 3 muestras de esputo, que fueron reportadas como contaminadas para el cultivo LJ.

Tabla No. 3: Resultados positivos y negativos, por muestra según ensayo diagnóstico para TB (N= 219)

Tipo de muestra\ Técnica	ZN		AR		LJ		MGIT	
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Aspirado Bronquial	2	4	3	3	3	3	3	3
Aspirado Oro traqueal	0	6	2	4	0	4	0	4
Biopsia	0	4	0	4	0	4	1	3
Esputo	10	134	18	126	17	69	17	72
Lavado Bronquial	2	9	2	9	2	7	2	7
Líquido Peritoneal	0	4	0	4	0	4	0	4
Líquido Pleural	0	21	0	21	0	21	0	21
Medula Ósea	0	4	0	4	0	4	0	4
Orina	1	5	1	5	1	5	1	5
Secreción	2	3	2	3	2	3	2	3
Otros ¹	2	9	1	10	0	11	0	11
Total	19	203	29	193	25	135	26	137

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

1: Otros incluyen (Absceso de tejido sólido, aspirado gástrico, aspirado traqueal, lavado gástrico, masa de cuello, líquido de muslo izquierdo, líquido pericardico, mielocultivo)

Anexo No. 10
Cálculos para la determinación de indicadores

Cálculos No. 1: Indicadores para muestras de esputos

A. Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	10	17	15	18
Negativo	131	123	75	72
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	3

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	17	1	18
Negativo	1	71	72
Total	18	72	90

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$17/(17+1) = 1 * 100$	94.44%
Especificidad	$72/(72+1) = 0.9863*100$	98.63%
Valor Predictivo Positivo	$17/(17+1) = 0.9444*100$	94.44%
Valor Predictivo Negativo	$72/(1+72) = 0.9863*100$	98.63%
Kappa	$2(17*72) + (1)/(18*72) + (72*17)$	0.96
		Optima

B. Ziehl Neelsen

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	10	0	10
Negativo	8	72	80
Total	18	72	90

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$10/(10+8) = 0.55 * 100$	55.55%
Especificidad	$72/(72+0) = 1*100$	100.00%
Valor Predictivo Positivo	$10/(10+1) = 1*100$	90.91%
Valor Predictivo Negativo	$72/(8+72) = 0.9*100$	90.00%
Kappa	$2(10*72)/(10*72) + (80*25)$	0.53
		Regular

Cálculos No. 2: Indicadores para muestras de Liquido Pleural

E. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	0	0	0	0
Negativo	21	21	21	21
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	0	21	21
Total	0	21	21

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA*
Especificidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Positivo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Negativo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Kappa	Dicho indicador no puede calcularse	NA

*No Aplica

Cálculos No. 3: Indicadores para muestras de Lavado Bronquial

A. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	2	2	4	4
Negativo	9	9	7	7
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2	2	4
Negativo	2	5	7
Total	4	7	11

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$2/(2+2) = 0.5 * 100$	50.00%
Especificidad	$5/(2+5) = 0.7143*100$	71.43%
Valor Predictivo Positivo	$2/(2+2) = 0.5*100$	50.00%
Valor Predictivo Negativo	$5/(2+5) = 0.7142*100$	71.43%
Kappa	$2(10+ 4)/ (28+28)$	0.50
		Regular

Cálculos No. 4: Indicadores para muestras de Aspirado Orotraquial

A. Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	0	2	2	2
Negativo	6	4	4	4
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2	0	2
Negativo	0	4	4
Total	2	4	6

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$2/(2+0) = 1 * 100$	100.00%
Especificidad	$4/(0+4) = 1 * 100$	100.00%
Valor Predictivo Positivo	$2/(2+0) = 1 * 100$	100.00%
Valor Predictivo Negativo	$4/(0+4) = 1 * 100$	100.00%
Kappa	$2(8+0)/(8+8)$	1.00 Perfecta

*No Aplica

B. Ziehl Neelsen

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2	0	2
Negativo	2	2	4
Total	4	2	6

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$2/(2+2) = 0.50 * 100$	50.00%
Especificidad	$4/ (4) = 1 * 100$	100.00%
Valor Predictivo Positivo	$2/(2+0) = 1 * 100$	100.00%
Valor Predictivo Negativo	$4/(2+4) = 0.66 * 100$	66.67%
Kappa	$2(2*4) + (2)/ (2*4) + (6*4)$	0.63 Buena

Cálculos No. 5: Indicadores para muestras de Orina

A. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	1	1	1	1
Negativo	5	5	5	5
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	1	0	1
Negativo	0	5	5
Total	1	5	6

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA*
Especificidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Positivo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Negativo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Kappa	Dicho indicador no puede calcularse	NA

*No Aplica

Cálculos No. 6: Indicadores para muestras de esputos Aspirado Bronquial

A. Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	2	3	3	3
Negativo	4	3	3	3
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	3	0	3
Negativo	0	3	3
Total	3	3	6

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$3/(3+0) = 1 * 100$	100.00%
Especificidad	$3/(0+3) = 1*100$	100.00%
Valor Predictivo Positivo	$3/(3+0) = 1*100$	100.00%
Valor Predictivo Negativo	$3/(0+3) = 1*100$	100.00%
Kappa	$2(3*3)/ (3*3)+(3*3)$	1.00 Perfecta

B. Ziehl Neelsen

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	3	1	4
Negativo	1	3	4
Total	4	4	8

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$3/(3+1) = 0.75 * 100$	75.00%
Especificidad	$3/(1+3) = 0.75*100$	75.00%
Valor Predictivo Positivo	$10/(10+0) = 1*100$	75.00%
Valor Predictivo Negativo	$72/(8+72) = 0.9*100$	75.00%
Kappa	$2(3*3)+ (1)/ (4*4)+(4*4)$	0.25 Pobre

Cálculos No. 7: Indicadores para muestras secreciones de heridas

A. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	2	2	2	2
Negativo	3	3	3	3
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2	0	2
Negativo	0	3	3
Total	2	3	5

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$2/(2+0) = 1 * 100$	100.00%
Especificidad	$3/(0+3) = 1*100$	100.00%
Valor Predictivo Positivo	$2/(2+0) = 1*100$	100.00%
Valor Predictivo Negativo	$3/(0+3) = 1*100$	100.00%
Kappa	$2(2*3)/ (2*3)+(3*2)$	1.00 Perfecta

Cálculos No. 8: Indicadores para muestras de Medula Ósea

A. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	0	0	0	0
Negativo	4	4	4	4
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	0	4	4
Total	0	4	4

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA*
Especificidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Positivo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Negativo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Kappa	Dicho indicador no puede calcularse	NA

*No Aplica

Cálculos No. 9: Indicadores para muestras de Biopsias de tejido sólido

A. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	0	0	1	1
Negativo	4	4	3	3
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	1	0	1
Negativo	1	3	4
Total	2	3	5

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	$1/(1+1) = 0.50 * 100$	50.00%
Especificidad	$3/(0+3) = 1*100$	100.00%
Valor Predictivo Positivo	$1/(1+0) = 1*100$	100.00%
Valor Predictivo Negativo	$3/(1+3) = 0.75*100$	75.00%
Kappa	$2(1*3)(0*1)/(1*3)+(4*2)$	0.73
		Buena

Cálculos No. 10: Indicadores para muestras de Líquido Peritoneal

A. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	0	0	0	0
Negativo	4	4	4	4
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	0	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	0	4	4
Total	0	4	4

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA*
Especificidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Positivo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Negativo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Kappa	Dicho indicador no puede calcularse	NA

*No Aplica

Cálculos No. 11: Indicadores para otros tipos de muestras (Absceso de tejido sólido, aspirado gástrico, aspirado traqueal, lavado gástrico, masa de cuello, líquido de muslo izquierdo, líquido pericardico, mielocultivo)

A. Ziehl Neelsen y Auramina Rodamina

	ZN	AR	MGIT	LJ
Positivo	0	0	0	0
Negativo	11	11	10	11
Dudoso	0	0	0	0
Contaminado	0	0	1	0

	Positivo	Negativo	Total
Positivo	0	0	0
Negativo	0	10	10
Total	0	10	10

Indicador	Calculo	Resultado
Sensibilidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA*
Especificidad	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Positivo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Valor Predictivo Negativo	Dicho indicador no puede calcularse	NA
Kappa	Dicho indicador no puede calcularse	NA

*No Aplica

Anexo No. 11

Resultados obtenidos en muestras de aspirado orotraqueal y aspirado bronquial

Tabla No. 4: Exactitud y concordancia de las técnicas de ZN y AR con respecto al cultivo LJ y MGIT, en muestras de aspirado orotraqueal (N= 6)

Indicador / Técnica	ZN¹ (IC 95%) ³	AR² (IC 95%)
Sensibilidad (%)	50.00 (0.00 – 100.00)	100.00 (75.00 – 100.00)
Especificidad (%)	100.00 (87.50 – 100.00)	100.00 (87.50 – 100.00)
VPP ⁴ (%)	100.00 (75.00 – 100)	100.00 (75.00 – 100.00)
VPN ⁵ (%)	66.67 (20.61 – 100.00)	100.00 (87.50 – 100.00)
Kappa⁶	0.63 (Buena)	1.00 (Perfecta)

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

1: ZN = Ziehl Neelsen / 2: AR= Auramina Rodamina / 3: Intervalo de Confianza al 95% / 4: VPP = Valor predictivo positivo / 5: VPN = Valor predictivo negativo / 6: Kappa= Índice de concordancia kappa

Tabla No. 5: Exactitud y concordancia de las técnicas de ZN y AR con respecto al cultivo LJ y MGIT, en muestras de aspirado bronquial (N= 6)

Indicador / Técnica	ZN¹ (IC 95%) ³	AR² (IC 95%)
Sensibilidad (%)	75.00 (20.07 – 100.00)	100.00 (83.33 – 100.00)
Especificidad (%)	75.00 (20.07 – 100.00)	100.00 (83.33 – 100.00)
VPP ⁴ (%)	75.00 (20.07 – 100.00)	100.00 (83.33 – 100.00)
VPN ⁵ (%)	75.00 (20.07 – 100.00)	100.00 (83.33 – 100.00)
Kappa⁶	0.63 (Buena)	1.00 (Perfecta)

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

1: ZN = Ziehl Neelsen / 2: AR= Auramina Rodamina / 3: Intervalo de Confianza al 95% / 4: VPP = Valor predictivo positivo / 5: VPN = Valor predictivo negativo / 6: Kappa= Índice de concordancia kappa

Anexo No. 12
Implementación del Protocolo de la Tinción Auramina Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias.

Fotografía No. 1: Capacitación al personal del ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD (clases magistrales)

La presente fotografía, fue tomada durante la capacitación al personal del ATBH, dentro de los cuales fueron capacitados: Supervisor del área (Químico Biólogo), personal técnico y estudiantes que realizarán el Ejercicio Profesional supervisado en dicho lugar.



Fuente: Fotografía obtenida durante la realización del trabajo de seminario “Diseño e implementación del protocolo para la tinción Auramina Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias”, realizado en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

Fotografía No. 2: Capacitación al personal del ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD (prácticas de laboratorio)

La fotografía que a continuación se presenta, muestra la realización de la práctica de laboratorio realizada como parte de la capacitación para la implementación de la presente técnica.



Fuente: Fotografía obtenida durante la realización del trabajo de seminario “Diseño e implementación del protocolo para la tinción Auramina Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias”, realizado en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

Fotografías No. 3, 4 y 5: Realización de parte experimental

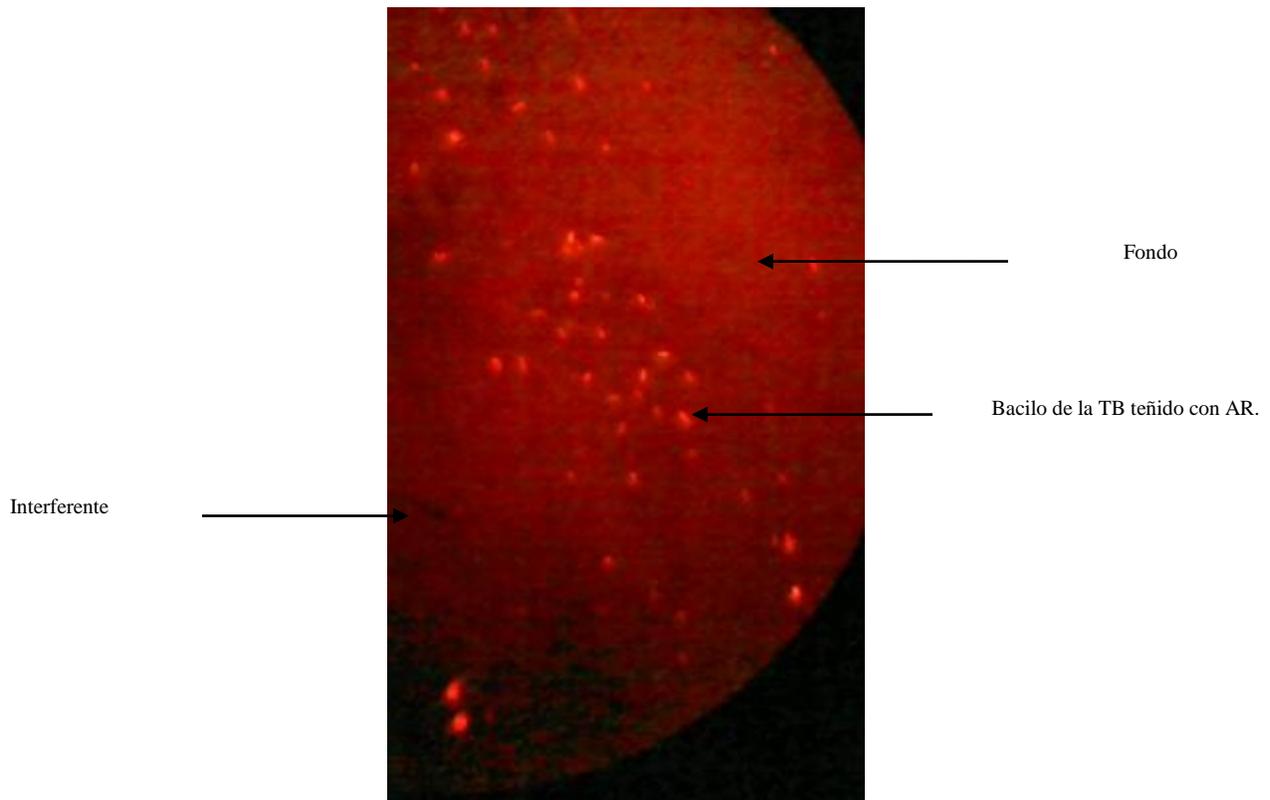
Las presentes fotografías, fueron tomadas durante la realización de la parte experimental correspondiente al presente trabajo de seminario.



Fuente: Fotografía obtenida durante la realización del trabajo de seminario “Diseño e implementación del protocolo para la tinción Auramina Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias”, realizado en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

Fotografía No. 6: Interpretación de lámina positiva para diagnóstico de TB

La fotografía que a continuación se presenta, evidencia la presencia de bacilos de la TB teñidos por medio de la técnica AR, los cuales presentan una coloración naranja y un fondo oscuro; también se puede observar la presencia de ciertos interferentes producto de la manipulación y realización de las láminas, los cuales como puede observarse no presentan fluorescencia.



Fuente: Fotografía obtenida tras la realización del trabajo de seminario “Diseño e implementación del protocolo para la tinción Auramina Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias”, realizado en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

Fotografía No. 7: Interpretación de lámina reportada como negativa para la tinción diferencial del ZN.

La presente fotografía, evidencia la presencia de un bacilo de la TB teñidos por medio de la técnica AR, dicha lámina fue reportada como negativa al momento de la realización del diagnóstico rápido utilizando la tinción de ZN.



Bacilo de la TB teñido con AR.

Fuente: Fotografía obtenida tras la realización del trabajo de seminario “Diseño e implementación del protocolo para la tinción Auramina Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias”, realizado en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD.

Fotografías No. 8, 9 y 10: Implementación del protocolo de la tinción Auramina Rodamina en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD

Las fotografías que a continuación se presentan, evidencian el material utilizado tras la implementación del protocolo para la tinción fluorescente AR.



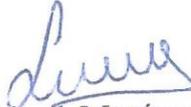
Fuente: Fotografía obtenida tras la realización del trabajo de seminario “Diseño e implementación del protocolo para la tinción Auramina Rodamina en el diagnóstico microscópico de micobacterias”, realizado en el ATBH del laboratorio clínico del HGSJDD



Juan Carlos Barrera Toledo
Autor



Brenda Graciela Domínguez García
Autora



Lilian Lizeth Martínez Morales
Autora



Licda. María Luisa García de López
Asesora



Lic. Cesar Roberto Conde Pereira
Asesor



Dra. Blanca Samayoa
Revisora



M.A. María Eugenia Paredes
Directora



Dr. Oscar Cobar
Decano