

SALUD

SECRETARÍA DE SALUD



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ISMAEL COSÍO VILLEGAS**





**MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2
LABORATORIOS**

MAYO, 2013

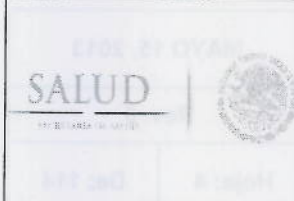

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 1	De: 114

ÍNDICE

	HOJA
INTRODUCCIÓN	3
I. OBJETIVO DEL MANUAL	4
II. MARCO JURÍDICO	5
III. RESPONSABILIDAD	27
IV. CÓDIGO DE PRÁCTICAS	28
1. ALCANCE	28
2. ACCESO	30
3. PROTECCIÓN PERSONAL	32
4. PROCEDIMIENTOS (GENERALIDADES)	33
5. PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS PARA EL MANEJO DE MICOBACTERIAS	42
6. ZONAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO	96
7. GESTIÓN DE LA BIOSEGURIDAD	96
V. DISEÑO E INSTALACIONES DEL LABORATORIO	97
1. CARACTERÍSTICAS DE DISEÑO DEL LABORATORIO	98
VI. MATERIAL DE LABORATORIO	101
1. MATERIAL DE BIOSEGURIDAD INDISPENSABLE	101
2. CARACTERÍSTICAS DE LA CÁMARA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA	102

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 2	De: 114

VII. VIGILANCIA MÉDICA INDISPENSABLE	106
1. NORMAS PARA LA VIGILANCIA DE LOS TRABAJADORES QUE MANIPULAN MICROORGANISMOS EN EL NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2	106
VIII. CAPACITACIÓN	107
IX. MANIPULACIÓN DE DESECHOS	109
1. DESCONTAMINACIÓN	109
2. PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN Y ELIMINACIÓN DE MATERIAL Y DESECHOS CONTAMINADOS	110
3. OBJETOS PUNZOCORTANTES	110
4. MATERIAL CONTAMINADO (POTENCIALMENTE INFECCIOSO) PARA SER TRATADO EN AUTOCLAVE O REUTILIZADO	111
5. MATERIAL CONTAMINADO (POTENCIALMENTE INFECCIOSO) PARA SER ELIMINADO	111
X. SEGURIDAD QUÍMICA, ELÉCTRICA Y RADIOLÓGICA, PROTECCIÓN CONTRA INCENDIOS Y MATERIAL DE SEGURIDAD	113
XI. AUTORIZACIÓN	114

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 3	De: 114

INTRODUCCIÓN

El Departamento de Laboratorios Clínicos en conjunto con el Servicio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, presentan en este documento las normas para el laboratorio con nivel 2 de bioseguridad.

Aquí se indican las pautas básicas de comportamiento destinadas a prevenir factores de riesgo laborales procedentes de agentes biológicos, físicos y/o químicos, relacionadas con el trabajo que en él se realiza.

El personal involucrado en los procesos que se llevaran a cabo en este laboratorio, deberá incorporar estas normas en todos los procedimientos que realicen, también es importante resaltar que su puntual cumplimiento no eliminan el riesgo de un accidente, sin embargo si lo previene en gran medida, además de establecer los procedimientos a seguir en caso de que ocurra.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 4	De: 114

I. OBJETIVO DEL MANUAL

El presente documento tiene como objetivo definir los requisitos de bioseguridad necesarios para favorecer el funcionamiento de un Laboratorio con nivel de bioseguridad 2, así como facilitar la identificación de riesgos relacionados con el manejo de agentes infecciosos, el manejo, transporte y desecho de muestras potencialmente infecciosas y la determinación de los procesos a realizar por los médicos, investigadores, químicos y demás personal involucrado en el desarrollo de actividades de dicho espacio controlado.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 5	De: 114

II. MARCO JURÍDICO

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

D.O.F. 05-II-1917.

Ref. 26-02-2013.

Leyes

Ley General de Salud.

D.O.F. 07-II-1984.

Ref. 08-IV-2013.

Ley Federal de las Entidades Paraestatales.

D.O.F. 14-V-1986.

Ref. 09-IV-2012.

Ley de la Comisión Nacional de los Derechos Humanos.

D.O.F. 29-VI-1992.

Ref. 15-VI-2012.

Ley Federal de Protección al Consumidor.

D.O.F. 24-XII-1992

Ref. 16-I-2013.

Ley Federal de Procedimiento Administrativo.

D.O.F. 04-VIII-1994.

Ref. 09-IV-2012.

Ley Federal del Derecho de Autor.

D.O.F. 24-XII-1996.

Ref. 27-I-2012.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 6	De: 114

Ley de Nacionalidad.

D.O.F. 23-I-1998.

Ref. 23-IV-2012.

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.

D.O.F. 04-I-2000.

Ref. 16-I-2012.

Ley de Obras Públicas y Servicios Relacionados con las Mismas.

D.O.F. 04-I-2000.

Ref. 09-IV-2012.

Ley General de Protección Civil.

D.O.F. 12-V-2000.

Ref. 06-VI-2012.

Ley de los Institutos Nacionales de Salud.

D.O.F. 26-V-2000.

Ref. 30-V-2012.

Ley Federal de Responsabilidades Administrativas de los Servidores Públicos.

D.O.F. 13-III-2002.

Ref. 15-VI-2012.

Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.

D.O.F. 11-VI-2002.

Ref. 08-VI-2012.

Ley Federal para Prevenir y Eliminar la Discriminación.

D.O.F. 11-VI-2003.

Ref. 09-IV-2012.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 7	De: 114

Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

D.O.F. 08-X-2003.

Ref. 30-V-2012.

Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

D.O.F. 18-III-2005.

Ley Federal de Archivos.

D.O.F. 23-I-2012.

Ley General de Protección Civil.

D.O.F. 06-VI-2012.

Códigos

Código Civil Federal.

D.O.F. 26-V-1928.

Ref. 08-IV-2013.

Código Penal Federal.

D.O.F. 14-VIII-1931.

Ref. 15-I-2013.

Código Federal de Procedimientos Civiles.

D.O.F. 24-II-1943.

Ref. 09-IV-2012.

Código Federal de Procedimientos Penales.

D.O.F. 30-VIII-1934.

Ref. 25-I-2013.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 8	De: 114

Reglamentos

Reglamento de la Ley de Información Estadística y Geográfica.

D.O.F. 03-XI-1982.

Ref. 24-III-2004.

Reglamento por el que se establecen las bases para la realización del internado de Pregrado de la Licenciatura de Medicina.

D.O.F. 09-XII-1983.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Prestación de Servicios de Atención Médica.

D.O.F. 14-V-1986.

Ref. 04-XII-2009.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios.

D.O.F. 06-I-1987.

Ref. 27-I-2012.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Publicidad

D.O.F. 04-V-2000.

Ref. 19-I-2012

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.



D.O.F. 06-I-1987.

Ref. 27-I-2012

Reglamento de la Ley Federal de las Entidades Paraestatales.

D.O.F. 26-I-1990.

Ref.09-IV-2012.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS	 INER	MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 9	De: 114

Reglamento de la Ley de Propiedad Industrial

D.O.F. 23-XI-1994.

Ref. 10-VI-2011.

Reglamento de la Ley Aduanera.

D.O.F. 06-VI-1996.

Ref. 28-X-2003.

Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo.

D.O.F. 21-I-1997.

Aclaración D.O.F. 28-I-1997.

Reglamento de la Ley Federal del Derecho de Autor.

D.O.F. 22-V-1998.

Ref. 14-IX-2005.

Reglamento de Insumos para la Salud.

D.O.F. 04-II-1998.

Ref. 17-V-2012.

Reglamento de la Ley Federal Sobre Metrología y Normalización.

D.O.F. 14-I-1999.

Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.

D.O.F. 09-VIII-1999.

Ref. 26-I-2011.

Reglamento de la Ley de Obras Públicas y Servicios Relacionados con las Mismas.

D.O.F. 28-VII-2010.

Reglamento de la Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.

D.O.F. 28-VII-2010.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 10	De: 114

Reglamento de procedimientos para la atención de quejas medicas y gestión pericial de la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.

D.O.F, 21-I-2003.

Ref. 25-VII- 2006.

Reglamento de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental.

D.O.F. 11-VI-2003.

Ref. 08-VI- 2012.

Reglamento de la Ley del Impuesto sobre la Renta.

D.O.F. 17-X-2003.

Ref. 04-XII-2006.

Reglamento Interno del Sistema Nacional de Certificación de Establecimientos de Atención Médica.

D.F.O. 19-V-2009.

Reglamento de becas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

D.O.F. 08-XII-2004.

Ref. 09-IV-2012.

Reglamento del Artículo 122 de la Ley Federal de Protección al Consumidor.

D.O.F. 27-VIII-2007.

Reglamento de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente en el Trabajo del Sector Público Federal.

D.O.F. 29-XI-2006.

Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.

D.O.F. 30-XI-2006.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 11	De: 114

Reglamento de la Ley del Impuesto al Valor Agregado.

D.O.F. 4-XII-2006.

Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

D.O.F. 19-III-2008.

Ref. 06-III-2009.

Reglamento de la Ley General de Acceso de las Mujeres a una Vida Libre de Violencia.

D.O.F. 11-III-2008.

Reglamento del Sistema Nacional de Investigadores.

D.O.F. 21-III-2008.

Ref. D.O.F. 25-VII-2011.

Aclaración 02-VIII-2011.

Reglamento de la Ley General para el Control de Tabaco.

D.O.F. 31-V-2009.

Reglamento Interior de la Comisión para la Certificación de Establecimientos de Atención Médica.

D.O.F. 22-VI-2009.

Ref. D.O.F. 22-VI-2012.

Reglamento de la Ley de Nacionalidad.

D.O.F. 17-VI-2009.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Publicidad

D.O.F. 04-V-2000.

Ref. 19-01-2012.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 12	De: 114

Decretos

Decreto por el que se crea el Consejo Nacional para la Prevención de Accidentes con el objeto de proponer las acciones en materia de prevención y control de accidentes a que se refiere el artículo 163 de la Ley General de Salud.

D.O.F. 20-III-1987.

Decreto por el que se crea la Comisión Nacional de Arbitraje Médico.

D.O.F. 03-VI-1996.

Decreto por el que se establecen los criterios para el otorgamiento de condecoración y premios en materia de salud pública.

D.O.F. 12-III-1997.

Ref. 22-VI-2011.

Decreto por el que se reforma el Consejo Nacional para la prevención y el control del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida y se abroga el diverso por el que se crea el Consejo Nacional para la prevención y control del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida, publicado el 24 de agosto de 1988.

D.O.F. 05-VII-2001.

Decreto por el que se establece el Sistema de Cartillas Nacionales de Salud.

D.O.F. 24-XII-2002.

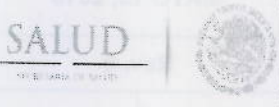

Fe de Erratas 28-II-2003.

Decreto por el que se crea el desconcentrado denominado Comisión Nacional de Bioética.

D.O.F. 07-IX-2005.

Decreto para realizar la entrega-recepción del informe de los asuntos a cargo de los servidores públicos y de los recursos que tengan asignados al momento de separarse de su empleo, cargo o comisión.

D.O.F. 14-IX-2005.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS	 INER	MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 13	De: 114

Decreto que establece las medidas de austeridad y disciplina del gasto de la Administración Pública Federal.

D.O.F. 04-XII-2006.

Decreto por el que se establecen diversas medidas en materia de adquisiciones, uso de papel y de la certificación de manejo sustentable de bosques por la Administración Pública Federal.

D.O.F. 05-IX-2007.

Decreto por el que se aprueba el Programa Especial de Mejora de la Gestión en la Administración Pública Federal 2008-2012.

D.O.F. 10-IX-2008.

Decreto por el que se establece el Reconocimiento en Enfermería María Guadalupe Cerisola Salcido.

D.O.F. 14-XI-2008.

Decreto por el que se aprueba el Programa Especial de Ciencia y Tecnología 2008-2012.

D.O.F. 16-XII-2008.



Acuerdos

Acuerdo por el que se crea la Comisión Interinstitucional para la formación de Recursos Humanos para la Salud.

D.O.F. 19-X-1983.

Acuerdo por el que se crea la Comisión Interinstitucional de Investigación en Salud.

D.O.F. 19-X-1983.

 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		 INER	MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS			Rev. 0	
				Hoja: 14	De: 114

Acuerdo que crea la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

D.O.F. 26-XII-1984.

Ref. 22-VIII-2007.

Acuerdo por el que se crea el Comité de Investigación en Salud.

D.O.F. 11-I-1985.

Acuerdo Número 55 por el que se integran los patronatos en las unidades hospitalarias de la Secretaría de Salud y se promueve su creación en los Institutos de Salud.

D.O.F. 17-III-1986.

Acuerdo Número 71 por el que se crea el sistema de Capacitación y Desarrollo del Sector Salud.

D.O.F. 20-IV-1987.

Acuerdo Número 86 por el que se crea la Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud.

D.O.F. 25-VIII-1989.

Acuerdo 114 por el que se ordena la distribución de habitaciones para investigadores de los Institutos Nacionales de Salud.

D.O.F. 08-X-1993.

Acuerdo por el que los titulares de las dependencias y entidades de la Administración Pública Federal del sector salud, consultarán a la Academia Nacional de Medicina y a la Academia Mexicana de Cirugía para la instrumentación de las políticas en materia de salud.

D.O.F. 26-IX-1994.

Acuerdo 130 por el que se crea el Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

D.O.F. 06-IX-1995.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 15	De: 114

Normas Oficiales Mexicanas

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993 para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

D.O.F. 18-VII-1994.

Aclaración D.O.F. 8-IX-1994.

F.E.D.O.F 23-II-1996.

Norma Oficial Mexicana NOM- 010-SSA2-1993 para la prevención y control de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana.

D.O.F. 17-I-1995.

Ref. 21-VI-2000.

Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.

D..O.F. 26-I-1995.

Ref. 27-IX-2005.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995 que establece los requisitos para la separación, envasado. Almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generen en establecimientos que presten atención médica.



D.O.F. 19-XI-1995.

Norma Oficial Mexicana NOM-005-SCT/2008 información de emergencia para el transporte de sustancias, materiales y residuos peligrosos.

D.O.F 14-VIII-2008.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

D.O.F 17-II-2003.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 16	De: 114

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

D.O.F 23-VI-2006.

Norma Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.

D.O.F 15-X-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.

D.O.F 16-X-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica.

D.O.F 19-II-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA3-2010, Que establece los objetivos funcionales y funcionalidades que deberán observar los productos de Sistemas de Expediente Clínico Electrónico para garantizar la interoperabilidad, procesamiento, interpretación, confidencialidad, seguridad y uso de estándares y catálogos de la información de los registros electrónicos en salud.

D.O.F. 08-IX-2010.

Norma Oficial Mexicana NOM-026-NUCL-1999, Vigilancia médica del personal ocupacionalmente expuesto a radiaciones ionizantes.

D.O.F. 05-VII-1999.

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994 para la vigilancia epidemiológica.

D.O.F. 11-X-1999.

Norma Oficial Mexicana NOM-005-SSA3-2010, que establece los requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de establecimientos para la atención médica de pacientes ambulatorios.

D.O.F. 16-VIII-2010.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 17	De: 114

Norma Oficial Mexicana NOM-173-SSA1-1998, para la atención integral a personas con discapacidad.

D.O.F. 19-XI-1999.

Norma Oficial Mexicana NOM-170-SSA1-1998 para la práctica de anestesiología.

D.O.F. 10-I-2000.

Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

D.O.F. 27-III-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-028-SSA2-1999, para la prevención, tratamiento y control de las adicciones.

D.O.F. 15-IX-2000.

Ref. 07-X-2010

Norma Oficial Mexicana NOM-020-SSA2-1994, para la prestación de servicios de atención médica en unidades móviles tipo ambulancias.

D.O.F. 11-IV-2000.

Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999 para la atención a la salud del niño.

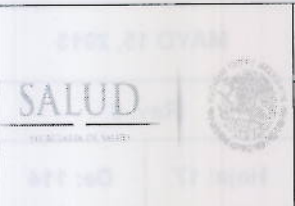

D.O.F. 09-II-2001.

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA3-2010 asistencia social. Prestación de servicios de asistencia social para niños, niñas y adolescentes en situación de riesgo y vulnerabilidad.

D.O.F. 26-II-2011.

Norma Oficial Mexicana NOM-208-SSA1-2002 Regulación de los Servicios de Salud para la práctica de ultrasonografía diagnóstica.

D.O.F. 04-III-2004.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 18	De: 114

Norma Oficial Mexicana NOM-205-SSA1-2002, Para la práctica de la cirugía mayor ambulatoria.

D.O.F. 27-VII-2004.

Norma Oficial Mexicana NOM-206-SS1-2002 regulación de los servicios de salud que establece los criterios de funcionamiento y atención en los servicios de urgencias de los establecimientos de atención médica.

D.O.F. 15-IX-2004.

Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA2-2004, En materia de información en salud.

D.O.F. 28-IX-2005.

Norma Oficial Mexicana NOM-137-SSA1-2008, Etiquetado de dispositivos médicos

D.O.F. 12-XII-2008.

Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales.

D.O.F. 20-XI-2009.

Norma Oficial Mexicana NOM-030-STPS-2009, Servicios preventivos de seguridad y salud en el trabajo-Funciones y actividades.

D.O.F. 22-XII-2009.

Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-003-SSA2-2008, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector (vigente por seis meses a partir de su prórroga)

D.O.F. 02-IV-2009.

Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-1999, para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial.

D.O.F. 17-I-2001

REF. 31-V-2010

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 19	De: 114

Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA3-2010, Para la práctica de la hemodiálisis
D.O.F. 08-VII-2010.

Norma Oficial Mexicana NOM-008-SSA3-2010, Para el tratamiento integral del sobrepeso y la
obesidad.
D.O.F.4-VIII-10.

Norma Oficial Mexicana NOM-024-SSA3-2010, Que establece los objetivos funcionales y
funcionalidades que deberán observar los productos de Sistemas de Expediente Clínico
Electrónico para garantizar la interoperabilidad, procesamiento, interpretación,
confidencialidad, seguridad y uso de estándares y catálogos de la información de los registros
electrónicos en salud
D.O.F.8-IX-2010.



Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la
diabetes mellitus.
D.O.F.23-X-2010.

Norma Oficial Mexicana NOM-249-SSA1-2010, Mezclas estériles: nutricionales y
medicamentosas, e instalaciones para su preparación
D.O.F. 4-III-2011.

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2010, Para la vigilancia epidemiológica, prevención
y control de las enfermedades transmitidas por vector.
D.O.F. 01-VI-2011.

Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA3-2011, Para la práctica de la anestesiología.
D.O.F.. 22-III-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012, Para la disposición de sangre humana y sus
componentes con fines terapéuticos.
D.O.F 16-X-2012.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 20	De: 114

Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-2012, Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano.

D.O.F.. 11-VII-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.

D.O.F.. 13-VII-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-026-SSA3-2012, Para la práctica de la cirugía mayor ambulatoria.

D.O.F.. 07-VIII-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA3-2012, Para la atención integral a personas con discapacidad.

D.O.F.. 14-IX-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-2012, Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano.

D.O.F. 11-VII-2012.

NORMA Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012, Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.

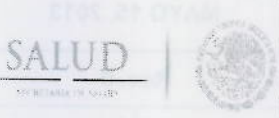

D.O.F. 13-VII-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-026-SSA3-2012, Para la práctica de la cirugía mayor ambulatoria.

D.O.F. 07-VIII-2012.

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA3-2012, Regulación de servicios de salud. Para la práctica de la acupuntura humana y métodos relacionados.

D.O.F. 18-IX-2012

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 21	De: 114

Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-001-SSA1-2012, Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos. Buenas prácticas de fabricación. Características técnicas y científicas que deben cumplir éstos para demostrar su seguridad, eficacia y calidad. Etiquetado. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad y farmacovigilancia D.O.F. 21-VIII-2012

Norma Oficial Mexicana NOM-241-SSA1-2012, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos dedicados a la fabricación de dispositivos médicos D.O.F. 11-X-2012

Planes y Programas

Programa Nacional de Salud 2007-2012.
D.O.F. 16-X-2007.

Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012.
D.O.F. 31-V-2007.

Programa Sectorial de Salud 2007-2012.
D.O.F. 17-I-2008.

Cuadros Básicos

Cuadro Básico y Catálogo de Instrumental y Equipo Médico.
Edición 2010.
D.O.F. 23-V-2011.

1ª. Actualización D.O.F. 20-VII-2011

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 22	De: 114

Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos

Edición 2010.

D.O.F. 13-V-2011.

2ª Actualización D.O.F. 20-VII-2011.

Sexagésima Tercera Actualización del Catálogo de Medicamentos Genéricos.

D.O.F. 07-XI-2008.

Modif. 17-I-2011.

Quincuagesima Primera Actualización del Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables.

D.O.F. 07-XI-2008.

Cuadro Básico y Catálogo de Auxiliares de Diagnóstico.]

2a. Actualización Edición 2009.

D.O.F. 29-VI-2010.

Cuadro Básico y Catálogo de Material de Curación.

Edición 2010.

D.O.F. 06-V-2011.

Quinta Actualización del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos.

Edición 2009.

D.O.F. 04-XI-2011.

Sexta Actualización de la Edición 2010 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamento

D.O.F. 26-XII-2011.

Octava Actualización de la Edición 2010 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos

D.O.F. 28-II-2012 ACUERDO que autoriza los Lineamientos de Racionalidad y Austeridad Presupuestaria para el Ejercicio Fiscal 2012, así como la autorización para su publicación..

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 23	De: 114

Cuadro Básico de Instrumental y Equipo Médico.

Edición 2009. Cuarta Actualización.

D.O.F. 15-III-2011.

Cuadro Básico y Catálogo de Material de Curación: Tomo II Material de Osteosíntesis y Endoprótesis,

Edición 2011

D.O.F. 04-V-2012

Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Instrumental y Equipo Médico: Tomo I Instrumental Médico

D.O.F. 11-V-2012

Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos

D.O.F. 15-V-2012

Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Instrumental y Equipo Médico: Tomo II Equipo Médico.

D.O.F. 18-V-2012

Segunda Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos.

D.O.F. 29-V-2012

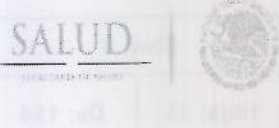

Tercera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos

D.O.F. 13-VI-2012

Nota Aclaratoria a la Tercera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos,

publicada el 13 de junio de 2012.

D.O.F. 05-IX-2012

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 24	De: 114

Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Material de Curación (Tomo I).

D.O.F. 21-VIII-2012.

Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Material de Osteosíntesis y Endoprótesis (Tomo II).

D.O.F. 21-VIII-2012.

Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Auxiliares de Diagnóstico.

D.O.F. 21-VIII-2012

Nota Aclaratoria a la Tercera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos, publicada el 13 de junio de 2012.

D.O.F. 05-IX-2012

Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Material de Curación (Tomo I).

D.O.F. 21-VIII-2012.

Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Material de Osteosíntesis y Endoprótesis (Tomo II).



D.O.F. 21-VIII-2012.

Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Auxiliares de Diagnóstico.

D.O.F. 21-VIII-2012.

Octava Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos

D.O.F. 08-X-2012

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 25	De: 114

Nota Aclaratoria a la Sexta Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos, publicada el 4 de septiembre de 2012

D.O.F. 10-X-2012

Sexta Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos

D.O.F. 04-IX-2012.

Nota Aclaratoria a la Tercera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos, publicada el 13 de junio de 2012

D.O.F. 05-IX-2012.

Séptima Actualización de la Edición de 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos

D.O.F. 13-IX-2012.

Nota Aclaratoria a la Primera Actualización de la Edición 2011 del Cuadro Básico y Catálogo de Auxiliares de Diagnóstico, publicada el 21 de agosto de 2012

D.O.F. 13-IX-2012.

Lineamientos

Lineamientos que deben observar las dependencias y entidades de la Administración Pública en la recepción, procesamiento y trámite de las solicitudes de acceso a la información gubernamental que formulen los particulares, así como las resoluciones y notificación, y la entrega de información en su caso, con exclusión de las solicitudes de acceso a datos personales y su corrección.

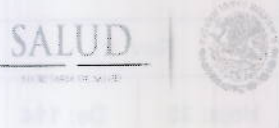

D.O.F. 12-VI-2003.

Ref. 02-XII-2008.

Lineamientos específicos para la aplicación y seguimiento de las medidas de austeridad y disciplina del gasto de la Administración Pública Federal.

D.O.F. 29-XII-2006.

Ref. 14-V-2007.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 26	De: 114

ACUERDO por el que se modifica el diverso por el que se dan a conocer los trámites y servicios, así como los formatos que aplica la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, inscritos en el Registro Federal de Trámites y Servicios de la Comisión Federal de Mejora Regulatoria publicado el 28 de enero de 2011.

D.O.F. 18-VII-2012.

Documentos Normativos

Normas Generales para el Registro, afectación, disposición final y baja de bienes muebles de la Administración Pública Federal Centralizada.

D.O.F. 30-XII-2004.

Normas que regulan los viáticos y pasajes para las comisiones en el desempeño de funciones en la Administración Pública Federal.

D.O.F. 28-XII-2007.

Lista de valores mínimos para desechos de bienes muebles que generen las dependencias y entidades de la Administración Pública Federal.

D.O.F. 30-VI-2011.

Relación única de la normativa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

D.O.F. 10-IX-2010.

Adición a la Relación única de la normativa del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

D.O.F. 01-VI-2011.

Lineamientos para la elaboración e integración de Libros Blancos y de Memorias Documentales.

D.O.F. 04-X-2011.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 27	De: 114

III. RESPONSABILIDAD

1. RESPONSABLE DEL LABORATORIO}

Dr. José Arturo Martínez Orozco

Encargado del Servicio de Microbiología Clínica.

2. REPRESENTANTE DE LA DIRECCIÓN

Dr. Víctor G. Hernández Morales

Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Paramédicos

3. RESPONSABILIDAD DEL PERSONAL DE LABORATORIO CLÍNICO

Q.F.B. Elia María Flores Pérez

Coordinadora del Servicio de Microbiología Clínica

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 28	De: 114

IV. CÓDIGO DE PRACTICAS

1. ALCANCE

Agente: Mycobacterium spp. Exceptuando M. tuberculosis, M. bovis o M. leprae

Pike informó 40 casos de "tuberculosis" no pulmonar que se creía estaban relacionados con accidentes o incidentes en el laboratorio o en la sala de autopsia⁶⁶. Presuntamente, estas infecciones se debieron a mycobacterias que no eran ni M. tuberculosis ni M. bovis. Varias micobacterias que son por naturaleza ubicuas se asocian con enfermedades distintas de la tuberculosis y de la lepra en humanos, animales domésticos y en el reino salvaje. Estos organismos son característicamente infecciosos pero no contagiosos. Clínicamente, las enfermedades asociadas con infecciones provocadas por estas micobacterias "atípicas" se pueden dividir en tres categorías generales:

- *Enfermedades pulmonares parecidas a la tuberculosis, que pueden asociarse a la infección provocada por M. kansasii, complejo de M. avium y, rara vez, por M. xenopi, M. malmoense, M. asiaticum, M. simiae y M. szulgai.*
- *Linfadenitis, que puede asociarse con la infección provocada por M. scrofulaceum, complejo de M. avium y, rara vez, por M. fortuitum y M. kansasii.*
- *Ulceras de piel e infecciones de heridas del tejido blando, que pueden asociarse con la infección provocada por M. ulcerans, M. marinum, M. fortuitum y M. chelonae.*

Riesgos de laboratorio: Los agentes pueden estar presentes en esputos, exudados de lesiones, tejidos y muestras ambientales (por ejemplo, suelo y agua). Los principales riesgos de laboratorio asociados con los materiales y cultivos clínicos son el contacto directo de la piel o las membranas mucosas con materiales infecciosos, la ingestión y la inoculación parenteral accidental. Los aerosoles infecciosos generados durante la manipulación de caldos de cultivos o de homogenatos de tejidos de estos organismos

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 29	De: 114

asociados con enfermedad pulmonar representan un peligro potencial de infección para el personal de laboratorio.

Precauciones Recomendadas: Para las actividades que implican la manipulación de materiales y cultivos clínicos de *Mycobacterium spp.*, que no sea ni *M. tuberculosis* ni *M. bovis*, se recomiendan las prácticas, el equipo de contención y las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2. Para los estudios con animales con mycobacterias que no sean *M. tuberculosis*, *M. bovis* o *M. leprae*, se recomiendan las prácticas, el equipo de contención y las instalaciones del Nivel de Bioseguridad Animal 2. Actualmente, no hay vacunas disponibles para su uso en humanos.

Agente: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*. Las infecciones con *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* (incluida la BCG) constituyen un peligro probado para el personal de laboratorio, así como para otras personas que puedan estar expuestas a aerosoles infecciosos en el laboratorio. Se ha informado que la incidencia de tuberculosis en el personal de laboratorio que trabaja con *M. tuberculosis* es tres veces mayor que la de quienes no trabajan con el agente. Los primates infectados natural o experimentalmente son una fuente probada de infección humana (por ejemplo, la tasa anual de conversión de tuberculina en el personal que trabaja con primates infectados es aproximadamente 70/10.000 en comparación con una tasa de menos de 3/10.000 en la población general). Los cobayos o ratones infectados experimentalmente no presentan el mismo problema, ya que estas especies no producen núcleos de gotitas al toser; sin embargo, la camilla de animales infectados puede contaminarse y servir como fuente de aerosoles infecciosos.

Riesgos de laboratorio: Los bacilos de tuberculosis pueden presentarse en el esputo, en los fluidos de lavaje gástrico, en el fluido cerebroespinal, en la orina y en lesiones de varios tejidos⁷⁴. El peligro más importante que se encuentra es la exposición a aerosoles generados en el laboratorio. Los bacilos de tubérculos pueden sobrevivir en especímenes fijados con calor y se pueden aerosolizar en la preparación de secciones congeladas y durante la manipulación de cultivos líquidos. Debido a la baja dosis infecciosa de *M. tuberculosis* en humanos (es decir, ID₅₀ <10 bacilos) y, en algunos laboratorios, a la alta tasa de aislamiento de organismos acidorresistentes de especímenes clínicos (>10%), los esputos y otros especímenes clínicos de casos de tuberculosis sospechada o conocida

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 30	De: 114



deben considerarse potencialmente infecciosos y deben ser manipulados con la precaución correspondiente.

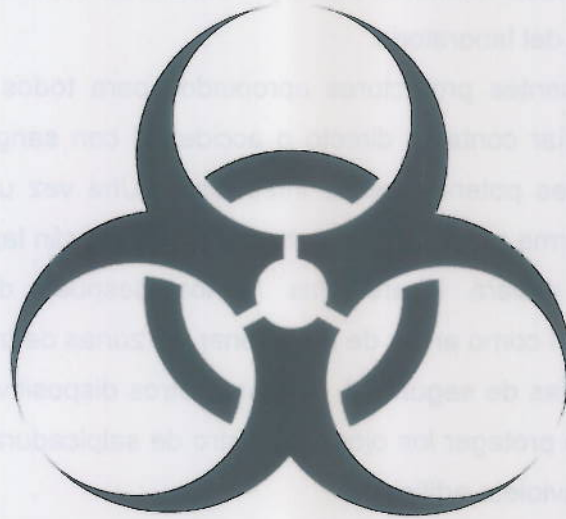
Precauciones Recomendadas: Para las manipulaciones de especímenes clínicos donde no hay aerosoles, como la preparación de especímenes acidorresistentes, se recomiendan las prácticas, el equipo de contención y las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2. Todas las actividades que generen aerosoles deben realizarse en un Gabinete de Seguridad Biológica Clase I o II. Se recomienda el uso de una bandeja corrediza con calor, en lugar de una de secado por llamas. La licuación y la concentración de esputos para la coloración de acidorresistencia también se pueden realizar en forma segura en la mesada, tratando previamente el espécimen (en un Gabinete de Seguridad Clase I o II) con un volumen equivalente al 5% de solución de hipoclorito de sodio (blanqueador doméstico no diluido) y esperando 15 minutos antes del centrifugado.

Para las actividades de laboratorio de propagación y manipulación de cultivos de *M. tuberculosis* o *M. bovis* y para estudios con animales utilizando primates no humanos infectados natural o experimentalmente con *M. tuberculosis* o *M. Bovis*, se recomiendan las prácticas, el equipo de contención y las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 3. Los estudios con animales utilizando cobayos o ratones se pueden realizar implementando el Nivel de Bioseguridad Animal 2.

2. ACCESO

- 2.1 El símbolo y signo internacional de peligro biológico estarán colocados en las puertas donde se manipulen microorganismos del grupo de riesgo 2 o superior en este caso *Mycobacterium spp.* Signo legible y no borrado.
- 2.2 Sólo podrá entrar en las zonas de trabajo del laboratorio el personal autorizado el cual tendrá acceso por huella digital. Entrada limitada al personal informado de todos los riesgos.
- 2.3 Las puertas del laboratorio se mantendrán cerradas.
- 2.4 No se autorizará ni permitirá la entrada de niños en las zonas de trabajo del laboratorio.

 SALUD <small>SECRETARÍA DE SALUD</small>	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS	 INER	MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 31	De: 114



PELIGRO BIOLÓGICO

**ACCESO RESTRINGIDO.
SÓLO PERSONAL AUTORIZADO**

Nivel de bioseguridad: _____



Investigador encargado: _____

En caso de emergencia, avísese a: _____

Teléfono diurno: _____

Teléfono particular: _____

**Las autorizaciones de entrada deberán solicitarse al
investigador encargado mencionado más arriba**

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 32	De: 114

3. PROTECCIÓN PERSONAL

- 3.1 Se usarán en todo momento batas y/o uniformes especiales para llevar a cabo el trabajo dentro del laboratorio.
- 3.2 Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
- 3.3 El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- 3.4 Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
- 3.5 Estará prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio, por ejemplo en cantinas, cafeterías, oficinas, bibliotecas, salas para el personal y baños.
- 3.6 No se usará calzado sin puntera.
- 3.7 En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- 3.8 Estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
- 3.9 La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios o taquillas que la ropa de calle.
- 3.10 Se recuerdan al personal del laboratorio las inmunizaciones/pruebas apropiadas para los agentes que se manejan, en este caso se hará registro de vacuna BCG y PPD en caso de contar con ellos.
- 3.11 Se recurre a los servicios médicos apropiados para las evaluaciones médicas, la vigilancia y el tratamiento de la exposición ocupacional. En este caso se enviara al servicio de urgencias del hospital y/o será valorado por el médico infectólogo Jefe de Servicio.
- 3.12 Se usa protección facial cuando se trabaja con material infeccioso fuera de la CSB con agentes infecciosos y antes de salir del laboratorio

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 33	De: 114

4. PROCEDIMIENTOS (Generalidades)

El llevar a cabo los procedimientos en el laboratorio se deberán respetar los siguientes puntos.

4.1 Pipetas:

- 4.1.1 Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.
- 4.1.2 Todas las pipetas tendrán tapones de algodón para reducir la contaminación de los dispositivos de pipeteo.
- 4.1.3 No debe mezclarse el material infeccioso aspirando y soplando alternativamente a través de una pipeta.
- 4.1.4 No se expulsarán a la fuerza los líquidos de una pipeta.
- 4.1.5 Son preferibles las pipetas aforadas con una muesca superior y otra inferior, ya que no exigen la expulsión de la última gota.
- 4.1.6 Las pipetas contaminadas deben sumergirse completamente en un desinfectante adecuado contenido en un recipiente irrompible y permanecer en él durante un tiempo suficiente antes de tirarlas.
- 4.1.7 Debe colocarse un recipiente para las pipetas usadas dentro (no fuera) de la CSB. No deben utilizarse para pipetear jeringuillas provistas de aguja hipodérmica.
- 4.1.8 En vez de agujas, existen dispositivos para abrir los frascos tapados con un diafragma que permiten usar pipetas y evitar el uso de agujas y jeringuillas hipodérmicas.
- 4.1.9 Para evitar la dispersión del material infeccioso que caiga accidentalmente de una pipeta, se recubrirá la superficie de trabajo con material absorbente, que se desechará como residuo infeccioso una vez utilizado.

4.2 No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas. Nunca se insuflará aire en un líquido que contenga agentes infecciosos.

4.3 Todos los procedimientos técnicos se practicarán de manera que se reduzca al mínimo la formación de aerosoles y gotículas.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 34	De: 114

- 4.4 Se limitará el uso de jeringuillas y agujas hipodérmicas, que no se utilizarán en lugar de dispositivos de pipeteo ni con ningún fin distinto de las inyecciones por vía parenteral o la aspiración de líquidos de las muestras de laboratorio.
- 4.5 Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al supervisor del laboratorio, en este caso la coordinadora o el médico jefe de servicio. Se mantendrá un registro escrito de esos accidentes e incidentes.
- 4.6 Se aplican procedimientos para reducir al mínimo los aerosoles y salpicaduras. Para evitar la dispersión de material infeccioso:
- 4.6.1 A fin de evitar que su carga caiga prematuramente, las asas microbiológicas deben tener un diámetro de 2–3mm y terminar en un anillo completamente cerrado. Los mangos no deben tener más de 6cm de longitud para reducir la vibración al mínimo.
- 4.6.2 Para evitar el riesgo de que se produzcan salpicaduras de material infeccioso al flamear las asas en el mechero de Bunsen, se utilizará un microincinerador eléctrico cerrado para esterilizar las asas. Es preferible utilizar asas desechables que no necesitan volver a ser esterilizadas.
- 4.6.3 Al secar muestras de esputo debe procederse con cuidado para evitar la creación de aerosoles.
- 4.6.4 Las muestras y los cultivos desechados destinados a la autoclave o a la eliminación se colocarán en recipientes impermeables, como las bolsas de desechos de laboratorio. La parte superior se cerrará (con cinta de autoclave) antes de tirarlas a los recipientes para desechos.
- 4.6.5 Las zonas de trabajo se descontaminarán con un desinfectante apropiado después de cada periodo de trabajo.
- 4.7 Se elaborará y seguirá un procedimiento escrito para la limpieza de todos los derrames.
- 4.8 Los líquidos contaminados deberán descontaminarse (por medios químicos o físicos) antes de eliminarlos por el colector de saneamiento.
- 4.9 Los documentos escritos que hayan de salir del laboratorio se protegerán de la contaminación mientras se encuentren en éste. Los formularios de petición de

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 35	De: 114

examen de la muestra no se colocarán alrededor de los recipientes, sino por separado, preferiblemente en sobres impermeables.

4.10 Para evitar fugas o derrames accidentales, deben utilizarse envases/embalajes secundarios (cajas) equipados con gradillas, de modo que los recipientes que contienen las muestras se mantengan en posición vertical. Los envases/embalajes secundarios pueden ser de metal o de plástico, pero deben poderse tratar en autoclave o ser resistentes a la acción de los desinfectantes químicos; de preferencia, el cierre debe tener una junta que garantice la estanqueidad. Deberán descontaminarse periódicamente.

4.11 Uso de las cámaras de seguridad biológica:

4.11.1 Se explicara a todos los posibles usuarios el modo de empleo y las limitaciones de estas cámaras tomando como referencia las normas nacionales y las publicaciones pertinentes. El personal recibirá protocolos escritos o manuales de seguridad o de operación. En particular, ha de quedar claro que la cámara no protege al trabajador de derrames, roturas o técnicas incorrectas.

4.11.2 La cámara no debe utilizarse si no funciona correctamente.

4.11.3 La ventana de vidrio transparente no debe abrirse mientras se está utilizando la cámara.

4.11.4 Los aparatos y materiales introducidos en la cámara deben reducirse al mínimo y no deben bloquear la circulación del aire en la cámara de distribución trasera.

4.11.5 No deben utilizarse mecheros de Bunsen en el interior de la cámara, ya que el calor producido perturbará el flujo de aire y puede dañar los filtros. Puede permitirse el uso de un microincinerador, aunque es preferible utilizar asas estériles desechables.

4.11.6 Todo el trabajo debe hacerse en la zona media o posterior de la superficie de trabajo y ser visible a través de la ventana.

4.11.7 El paso de personas por detrás del trabajador debe reducirse al mínimo.

4.11.8 El trabajador no debe alterar el flujo de aire al sacar y volver a introducir repetidas veces los brazos.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 36	De: 114

- 4.11.9 Las rejillas de aire no deben estar bloqueadas con papeles, pipetas u otros materiales, pues con ello se perturba el flujo de aire y puede provocarse la contaminación del material y la exposición del trabajador.
- 4.11.10 La superficie de la CSB deberá limpiarse con un paño empapado con un desinfectante apropiado una vez terminado el trabajo y al final del día.
- 4.11.11 El ventilador de la cámara se encenderá al menos 5 minutos antes de empezar el trabajo y debe seguir funcionando al menos durante 5 minutos después de concluido el trabajo.
- 4.11.12 Nunca se introducirán papeles en las CSB.
- 4.12 **Uso de las centrifugadoras:**
- 4.12.1 El funcionamiento mecánico satisfactorio es un requisito de la seguridad microbiológica del empleo de centrifugadoras en el laboratorio.
- 4.12.2 Las centrifugadoras se utilizarán según las instrucciones del fabricante.
- 4.12.3 Las centrifugadoras deben colocarse a una altura tal que los trabajadores puedan ver la cubeta para colocar correctamente los soportes y los cestillos.
- 4.12.4 Los tubos de la centrifugadora y los recipientes de muestras destinados al uso en la centrifugadora deben estar fabricados de vidrio grueso o, preferiblemente, de plástico, y deben inspeccionarse para detectar defectos antes de usarlos.
- 4.12.5 Los tubos y los recipientes para muestras deben estar siempre bien cerrados (con tapón de rosca si es posible) para la centrifugación.
- 4.12.6 Los cestillos deben cargarse, equilibrarse, cerrarse y abrirse en una CSB.
- 4.12.7 Los cestillos y los soportes se deben emparejar por el peso y equilibrar correctamente con los tubos en su sitio.
- 4.12.8 El espacio que debe dejarse entre el nivel del líquido y el borde de cada tubo de centrifugación debe ser especificado en las instrucciones del fabricante.
- 4.12.9 Para equilibrar los cestillos vacíos se empleará agua destilada o alcohol (propanol al 70%). No se empleará suero salino ni solución de hipoclorito porque ambos productos corroen los metales.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 37	De: 114

4.12.10 Cuando se utilicen rotores de cabeza angular, debe velarse por que el tubo no esté excesivamente cargado, ya que puede haber fugas del líquido.

4.12.11 El interior de la cubeta de la centrifugadora se inspeccionará a diario para observar si existen manchas o suciedad en el rotor. Si éstas son manifiestas, se deben examinar de nuevo los protocolos de centrifugación.

4.12.12 Los rotores y los cestillos de la centrifugadora deben observarse diariamente para detectar signos de corrosión y grietas.

4.12.13 Los cestillos, los rotores y la cubeta de la centrifugadora deben descontaminarse después de cada uso.

4.12.14 Después del uso, los cestillos se depositarán en posición invertida a fin de vaciarel líquido utilizado para equilibrar.

4.12.15 Al utilizar centrifugadoras pueden expulsarse partículas infecciosas transportadas por el aire, el empleo de una buena técnica de centrifugación y de tubos tapados correctamente ofrece protección suficiente contra los aerosoles infecciosos y la dispersión de partículas.

4.13 Uso de homogeneizadores, agitadores, mezcladores y desintegradores ultrasónicos:

4.13.1 No deben utilizarse homogeneizadores domésticos (de cocina) en el laboratorio, pues pueden tener fugas o desprender aerosoles. Los mezcladores y homogeneizadores de laboratorio son más seguros.

4.13.2 Los tapones y los recipientes o frascos deben estar en buenas condiciones, sin deformaciones ni fisuras. Los tapones deben ajustar bien y las juntas deben estar en buen estado.

4.13.3 Durante el funcionamiento de los homogeneizadores, agitadores y desintegradores ultrasónicos se produce un aumento de la presión dentro del recipiente, con lo que pueden desprenderse entre la tapa y el recipiente aerosoles con materiales infecciosos. Se usaran recipientes de plástico, en particular de politetrafluoroetileno (PTFE), porque el vidrio puede romperse y liberar material infeccioso, e incluso herir al trabajador.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 38	De: 114

4.13.4 Durante su utilización, hay que recubrir los aparatos con una funda fuerte de plástico transparente, que se desinfectará una vez usada. Siempre que sea posible, estos aparatos, con su funda de plástico, se utilizarán dentro de una CSB.

4.13.5 Una vez terminada la operación, el recipiente se abrirá en una CSB.

4.13.6 Las personas que utilicen desintegradores ultrasónicos deben llevar protección auditiva.

4.14 Mantenimiento y uso de refrigeradores y congeladores:

4.14.1 Los refrigeradores, congeladores y recipientes de nieve carbónica deben descongelarse y limpiarse periódicamente; se eliminarán todos los tubos, ampollas y otros objetos que se hayan roto durante el almacenamiento. Durante la limpieza se debe utilizar protección facial y guantes de goma gruesa. Después de la limpieza se desinfectarán las superficies interiores de la cámara.

4.14.2 Todos los recipientes almacenados en refrigeradores y congeladores deben llevar etiquetas bien claras con el nombre científico del contenido, la fecha de almacenamiento y el nombre de la persona que los ha almacenado. Los materiales sin etiquetas y anticuados deben tratarse en la autoclave y desecharse.

4.14.3 Debe mantenerse un inventario del contenido de los refrigeradores y congeladores.

4.14.4 No deben guardarse nunca soluciones inflamables en refrigeradores, excepto si estos son a prueba de explosión. En las puertas de los refrigeradores se colocarán advertencias al respecto.

4.15 Recolección, etiquetado y transporte de muestras:

4.15.1 Se seguirán siempre las precauciones normalizadas; se usarán guantes en todos los procedimientos.

4.15.2 Los tubos se colocarán en recipientes apropiados para el transporte al laboratorio y dentro del laboratorio. Los formularios de petición de examen se colocarán en bolsas o sobres impermeables separados.

4.15.3 El personal de recepción no debe abrir estas bolsas.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 39	De: 114

- 4.15.4 Las muestras infecciosas se transportan fuera de la CSB en recipientes aprobados, siguiendo las normas de transporte aprobadas.
- 4.15.5 Los recipientes para muestras son de plástico, deben ser fuertes y no permitir fugas cuando la tapa o el tapón estén correctamente colocados.
- 4.15.6 En el exterior del recipiente no debe quedar ningún material.
- 4.15.7 Los recipientes han de estar correctamente rotulados para facilitar su identificación.
- 4.15.8 Debido a que se reciben un elevado número de muestras se destina un local o zona especial con este propósito.
- 4.15.9 El personal que recibe y desempaqueta las muestras debe conocer los riesgos para la salud que entraña su actividad y estará capacitado para adoptar precauciones normalizadas, particularmente cuando manipule recipientes rotos o con fugas.
- 4.15.10 Los recipientes primarios de las muestras deben abrirse en una CSB. Se dispondrá de desinfectantes.

4.16 Apertura de tubos de muestras y muestreo del contenido

- 4.16.1 Los tubos de muestras deben abrirse en una CSB.
- 4.16.2 Deben usarse guantes.
- 4.16.3 También se recomienda proteger los ojos y las mucosas (gafas de seguridad de tipo máscara o viseras).
- 4.16.4 Las prendas de protección se complementarán con un delantal de plástico.
- 4.16.5 Para sacar el tapón, éste se agarrará con un trozo de papel o de gasa con el fin de evitar salpicaduras.

4.17 Vidrio y objetos punzantes y cortantes:

- 4.17.1 Siempre que sea posible, se sustituirá el material de vidrio por material de plástico.
- 4.17.2 Sólo se utilizará vidrio duro especial para laboratorio (borosilicato); se desechará todo artículo que esté astillado o agrietado.
- 4.17.3 No se utilizarán agujas hipodérmicas para pipetear.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 40	De: 114

4.18 *Extensiones y frotis para el examen microscópico:*

4.18.1 La fijación y tinción de muestras de sangre, esputo y heces para el microscopio no destruye necesariamente todos los organismos o los virus de las extensiones.

4.18.2 Éstas deben manipularse con pinzas, almacenarse cuidadosamente y descontaminarse o tratarse en autoclave antes de eliminarlas.

4.19 *Descontaminación:*

4.19.1 Para la descontaminación se recomiendan hipocloritos y desinfectantes de alto nivel.

4.19.2 Las soluciones de hipoclorito recién preparadas contendrán cloro disponible a razón de 1 g/l para uso general, y de 5 g/l para limpiar derrames de sangre.

4.19.3 Para la desinfección de superficies puede utilizarse glutaraldehído.

4.20 *Lavado y descontaminación de las manos:*

4.20.1 Siempre que sea posible, se llevarán guantes apropiados cuando se manipulen materiales biológicos peligrosos, a pesar de ello, los guantes no obvian la necesidad de que el personal se lave las manos de forma regular y correcta.

4.20.2 Las manos se lavarán después de manipular materiales biológicos peligrosos y animales, y antes de abandonar el laboratorio.

4.20.3 En la mayoría de las situaciones, un lavado concienzudo de las manos con jabón normal y agua basta para descontaminarlas, pero en las situaciones de alto riesgo se recomienda utilizar jabones germicidas.

4.20.4 Se formará espuma abundante con el jabón y se frotarán bien las manos, durante un mínimo de 10 segundos; a continuación se aclararán en agua limpia y se secarán con una toalla de papel o un paño limpio.

4.20.5 Se recomiendan los grifos accionados con el pie o el codo, cuando no existan, debe utilizarse una toalla de papel o paño para cerrar los mandos de los grifos con el fin de evitar volver a contaminarse las manos ya lavadas. Como ya se ha dicho, pueden realizarse friegas con alcohol ó gel alcohol en las manos para descontaminarlas cuando estén

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 41	De: 114

ligeramente sucias y no se pueda lavarlas con agua y jabón. Se capacitará para técnica adecuada de lavado de manos institucional. (El Departamento de Calidad estaba capacitando junto con el Departamento de Enfermería)

- 4.21 El personal debe leer, revisar y seguir las instrucciones sobre prácticas y procedimientos, lo anterior deberá realizarse al menos una vez al año de manera obligatoria para todas las personas involucradas en los procesos del laboratorio.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 42	De: 114

5. PROCEDIMIENTOS ESPECÍFICOS PARA EL MANEJO DE MICOBACTERIAS

5.1 MANEJO DEL PRODUCTO

a) Expectoración:

- La muestra debe recibirse en recipientes estériles proporcionados por el laboratorio.
- La muestra característicamente debe ser mucosa, muco purulento ó sanguinolento.
- No debe depositarse el producto de más de una expectoración en el mismo frasco.
- La muestra puede almacenarse en refrigeración 2°C–8°C por 48h máximo, antes de su procesamiento.
- Realizar el proceso de descontaminación y cultivo señalado en el punto 5.1..1
- En este tipo de muestra se realiza el frotis de Auramina-Rodamina (Ver procedimiento de tinciones PROM-07 y PROM-13 A).

b) Lavado bronquio alveolar, lavado bronquial y aspirado bronquial:

- Centrifugar el total de la muestra a 3000g., durante 20 min. desechar el sobrenadante.
- Realizar el procedimiento de descontaminación detallado en el punto 1.1
- En este tipo de muestra se realiza el frotis de Auramina-Rodamina. (Ver procedimiento de Baciloscopias PROM-13 A y PROM-07 Tinciones generales).

c) Orina:

- La orinas deben recibirse en serie de tres muestras proporcionadas cada una en días consecutivos.
- Deben procesarse en forma individual.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 43	De: 114

- Centrifugar el total de la muestra a 3000 g., durante 20 min. desechar el sobrenadante.
- Del sedimento realizar el procedimiento de descontaminación y el cultivo señalado en el punto 1.1.
- En este tipo de muestra no se realiza el frotis de **Auramina-Rodamina**. (Ver procedimiento de Baciloscopias PROM-13A y PROM-07 Tinciones generales).

d) Líquidos corporales (Líquido pleural, ascitis, sinovial, peritoneal, pericárdico, etc.):

- Centrifugar el total de la muestra a 3000 g., durante 20 min. desechar el sobrenadante.
- Del sedimento realizar el procedimiento de descontaminación y el cultivo señalado en el punto 1.1.
- Realizar el frotis para la tinción de Auramina-Rodamina . (Ver procedimiento de Baciloscopias PROM-13A y PROM-07 Tinciones generales).

e) Líquido cefalorraquídeo:

- El cultivo de este producto se realiza en la sección de siembras
- Este líquido corporal se siembra directamente en medio líquido suplementado con solución de antibióticos y suplemento de crecimiento. Ver procedimiento PROM-06.
- En caso de contar con un volumen mayor a 1 ml centrifugar la muestra a 3500 r.v.p. durante 10 min.
- Realizar el frotis para la tinción de Auramina-Rodamina. (Ver procedimiento de Baciloscopias PROM-13A y PROM-07 Tinciones generales).

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 44	De: 114

f) Lavado gástrico:

- El lavado gástrico debe procesarse en serie de 3 muestras. La muestra deberá ser recibida en un envase estéril que contenga 100 mg de carbonato de sodio para neutralizar el pH de la muestra.
- Las muestras de jugo gástrico deben ser proporcionadas cada una en días consecutivos.
- Debe procesarse en forma individual.
- Centrifugar el total de la muestra a 3000 g., durante 20 min. desechar el sobrenadante
- Realizar el procedimiento de descontaminación y cultivo detallado en el punto 1.1
- No se realiza frotis de Auramina-Rodamina.

g) Biopsias, Nódulo linfáticos, Piel, Tejidos:

- El macerado de la muestra se realiza en el área de siembras.
- Una porción de este macerado se utiliza para realizar el proceso de descontaminación y cultivo detallados en el punto 1.1.
- Apartar 1 ml del sedimento descontaminado para confirmar el resultado del cultivo y mantener en refrigeración a 8 ° C.
- En caso de que el cultivo inicial se contamine tomar la muestra reservada para estas situaciones. Realizar nuevamente el procedimiento de descontaminación y cultivo detallado en el punto 1.1
- Realizar frotis del sedimento y teñir por Auramina-Rodamina. (Ver procedimiento general de Baciloscopias PROM-13A y PROM-07 Tinciones generales).

h) Hemocultivos y Mielocultivos

Los frascos de hemocultivos para micobacterias detectados como positivos por el equipo BACTEC 9120 son retirados del equipo y son enviados a la sección de TB para su análisis. En el caso de hemocultivos finalizados

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 45	De: 114

como negativos por el equipo entregar el frasco a la sección de micobacterias para su evaluación:

- Realizar un frotis y teñir por Z-N para la confirmación de bacilos ácido alcohol resistente.
- Sembrar la muestra en una placa de agar gelosa sangre.
- Incubar la placa de 24 – 48 HR a 35 ° C
- Si la tinción de Z-N es positiva tomar 0.5 ml de muestra y sembrarla en un frasco MGIT.
- Una vez positivo realizar una segunda resiembra para la eliminación de eritrocitos que interfieren en la identificación automatizada.
- Seguir el procedimiento del manual de la sección señalado en el punto 1.2 Procedimiento de cultivo en medio líquido (BACTEC MGIT) para *M. tuberculosis*.
- Realizar la identificación de acuerdo al punto 2.2 identificación automatizada del manual de procedimiento de esta sección.
- Realizar la sensibilidad de acuerdo al punto 2.4 de pruebas de sensibilidad por método automatizado del manual de la sección.
- En el caso de observarse en la tinción otro tipo de microorganismos (bacterias y hongos) los cultivos son referidos a la sección correspondiente para su seguimiento.
- Reportarlos como "cultivo con desarrollo de bacterias, de hongos o levaduras." de acuerdo a la fecha en que se registro como positivo.
- Si el Z-N y el gram son negativos regresar el frasco de hemocultivo al equipo BACTEC para finalizar su seguimiento.

5.1.1 Procedimiento de descontaminación de muestras.

5.1.1.1 Registradas y revisadas las muestras para cultivo de tuberculosis se deberán dividir el 50 % de las muestras recibidas entre los dos técnicos para evitar el riesgo de contaminación por manipulación de los cultivos.

5.1.1.2 Las muestras deben ser procesadas de acuerdo a los siguientes métodos de descontaminación:

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 46	De: 114

- Descontaminación con Hidróxido de Sodio al 2 %: procesar por este método solo los líquidos orgánicos que no presenten aspecto mucoso y purulento; LBA no mucosos y no purulentos, y biopsias.
- Descontaminación con Hidróxido de Sodio al 4 % / N-acetil-L-cisteína: procesar por este método de descontaminación solo los productos que presenten macroscópicamente aspecto purulento y/o mucoso como: expectoraciones, LBA, aspirados bronquiales, abscesos, orinas, jugos gástricos, y líquidos corporales.

5.1.1.3 En una gradilla colocar las muestras en tubos de centrifuga estériles de 50 ml con tapón de rosca, etiquetados con el folio correspondiente a cada muestra.

5.1.1.4 En general las muestras para descontaminación deben ser colocadas en cada tubo de plástico estéril y agregar: un volumen máximo de 10 ml de muestra (expectoraciones y / o muestras diversas según aplique) o del sedimento de la muestra centrifugada y adicionar a igual volumen una solución de hidróxido de sodio al 4%-citrato de sodio al 0.1M más N-acetil cisteína 0.5% o hidróxido de sodio al 2% según aplique (Concentración 1:1). La concentración final de NaOH en el tubo es de 1%.

5.1.1.5 En el caso de contaminación por *Pseudomonas aeruginosa*, descontaminar el cultivo con una solución de ácido oxálico al 5% a volúmenes iguales de la muestra o del sedimento. Nota: en caso de conocer que la muestra presenta desarrollo con *Pseudomonas* antes del procedimiento de descontaminación, agregar a la solución descontaminante un poco de N-L-acetil cisteína.

5.1.1.6 Mezclar el contenido del tubo aproximadamente 20 segundos en vortex hasta su licuefacción. Las muestras deben homogenizarse, para liberar el bacilo del moco, material celular y tejidos que puedan acompañarlo.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 47	De: 114

5.1.1.7 Incubar la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C) mezclando ocasionalmente las muestras. Es importante que el contacto con el agente de descontaminación sólo sea por 15 min., ya que un tiempo más prolongado reduce la recuperación de micobacterias. Evitar movimientos que causen aeración de la muestra, ya que el NALC rápidamente es inactivado por oxidación. Una pequeña cantidad de cristales de NALC pueden ser adicionados a muestras especialmente viscosas para una mejor licuefacción. Si se requiere de una descontaminación más activa, aumentar la concentración de NaOH en proporción al tiempo de la muestra expuesta al digestivo.

5.1.1.8 Llevar a un volumen de 35 ml de buffer de fosfatos pH 7 estériles y agitar en el Vortex.

5.1.1.9 Centrifugar 20 min., de 3000 rpm., a 3250 rpm., durante éste proceso en el que se producen aerosoles debe cuidarse en forma especial el cierre hermético de los tubos y de la centrifuga. 7. I

5.1.1.10 Decantar el fluido sobrenadante en un dispositivo a prueba de salpicaduras que contenga fenol al 5% o cloro al 10% del sedimento antes de ser neutralizado realizar el frotis y teñir por Auramina-Rodamina.

5.1.1.11 Agregar al tubo de 3 – 4 ml de Buffer de fosfatos pH=7.0 estéril y agitar en vortex.

5.1.1.12 Medir el pH de la muestra con una tira reactiva y compararlo con la referencia indicada en la caja del producto. Neutralizar con HCl 1N ó Hidróxido de sodio 1N según sea el caso. El proceso de neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH no sea menor de 6.5 ni mayor de 7.2.

5.1.1.13 Realizar control de pureza de las soluciones anteriormente mencionadas poniendo una gota de cada una de ellas en placas de gelosa sangre e incubar de 24-48 hrs. a 35 ° C.

5.1.1.14 Generar en el sistema MGIT la etiqueta para los tubos de cultivo con los siguientes datos: fecha, folio, ubicación y nombre del paciente.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 48	De: 114

5.1.1.1.1 Inoculación del medio de cultivo sólido Lowenstein Jensen:

1. Sembrar en dos tubos de LJ y un tubo de LJ con Citrato Férrico Amoniaco al 2% (para la recuperación de *M. haemophilum*) previamente identificados solo en el caso de tratarse de pacientes con diagnóstico de VIH.
2. Con una pipeta Pasteur se toma el sedimento, inocular 4 a 5 gotas en cada tubo de medio sólido LJ, dejando escurrir sobre la superficie del medio sin tocarlo, no es recomendable la siembra directa, de un tubo a otro, porque favorece la contaminación del medio.
3. Sembrar una gota del sedimento en una placa de agar sangre de carnero como control microbiológico de la muestra e incubar la placa a 35° C por 48hrs. y registrar los resultados en la bitácora PROM-12A.

5.1.1.1.2 Incubación:

Incubar los tubos de LJ en posición horizontal, con la tapa semi-abierta en la estufa de cultivo para micobacterias a una temperatura de 35° a 37 ° C en una atmósfera de 5% CO₂; y el tubo de Citrato Férrico a una temperatura de 30 ° C.

5.1.1.1.3 Revisión de Cultivos:

- Los tubos con el medio de cultivo se examinan por primera vez a los 3 - 7 días de realizada la siembra, con el objeto de verificar que la parte líquida de la siembra se haya evaporado completamente, lo que permite el desarrollo adecuado del bacilo.
- Las tapas deben ajustarse firmemente para impedir la desecación del medio durante el tiempo de

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 49	De: 114

incubación y para saber si alguno está contaminado o alterado por mala neutralización de la muestra.

- Los tubos contaminados se descontaminan nuevamente y se sigue el procedimiento anteriormente señalado en el punto 1.1, y si ambos tubos de nuevo se contaminan se solicita nueva muestra.
- Si hay contaminación por flora secundaria se aprecia el desarrollo de colonias, en ocasiones el medio puede estar licuado por la acción de gérmenes proteolíticos (*Pseudomonas*) utilizar ácido oxálico como agente descontaminante.
- Si existe contaminación con hongos, el cultivo no se descontamina se envía el cultivo a la sección de hongos para su identificación.
- La revisión de los cultivos deberá hacerse semanalmente hasta completar un periodo de incubación de 9 semanas registrando los hallazgos encontrados del cultivo en la bitácora PROM-12A.

5.1.1.1.4 Interpretación de los cultivos

- Cultivo Negativo: no se observa desarrollo de colonias sospechosas de micobacterias al finalizar el seguimiento de cada cultivo. "Debe reportarse como "cultivo negativo a los 60 días"
- Cultivo Positivo: se observan colonias de crecimiento lento (a partir de la cuarta semana) se debe realizar un frotis y teñir por Ziehl-Neelsen (Ver procedimiento de Baciloscopias PROM-13A); anotando en la bitácora de Registro de Cultivo de Micobacterias PROM-12A, si son bacilos ácido alcohol resistente o no.

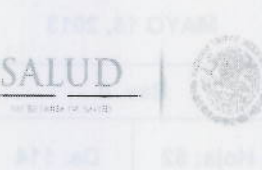

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 50	De: 114

- Cuando el frotis resulte positivo a BAAR permitir el crecimiento bacteriano e incubar hasta que las colonias sean suficientemente grandes para su descripción morfológica, proceder a su identificación.
- Si se obtiene un desarrollo escaso: 1) de una a 20 colonias en el medio sólido y sin desarrollo en el medio líquido, tomar todo el crecimiento y pasarlo a un tubo con perlas y suplemento de crecimiento o agua destilada estéril y resembrarlo en un tubo MGIT. 2) si se obtiene crecimiento en medio líquido, diseminar la cepa en el mismo tubo de LJ para obtener un mayor número de colonias.
- El informe del cultivo debe ser cualitativo y semicuantitativo, para lo cual se recomienda la siguiente escala:

NEGATIVO (-)	No se observan colonias
POSITIVO 1 a 19	El número total de colonias en los tubos sembrados cuando hay menos de 20
POSITIVO (+)	Presencia de 20 a 100 colonias
POSITIVO (++)	Colonias separadas (más de 100)
POSITIVO (+++)	Colonias confluentes
CONTAMINADO	Cultivo contaminado

5.1.2 Procedimiento de cultivo en medio líquido (MIGIT) para *M. tuberculosis*.

El sistema automatizado para cultivo de micobacterias proporciona la ventaja de recuperar más rápidamente las micobacterias en comparación con el cultivo convencional y así proporcionar al paciente sus resultados en aproximadamente 1 mes. Preparar los reactivos necesarios para esta prueba de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 51	De: 114

5.1.2.1 Procedimiento:

Las muestras previamente descontaminadas en condiciones asépticas se deberán sembrar en el medio líquido siguiendo el procedimiento que a continuación se detalla:

1. Reconstituya un tubo liofilizado del PANTA con 15 ml de suplemento de crecimiento OADC BCTEC MGIT.
2. Identifique el tubo MGIT con el número de folio de la muestra.
3. Antes de la inoculación de la muestra destape el tubo y añada asépticamente 0.8 ml, de suplemento de crecimiento OADC/PANTA.
4. Añada 0.5 ml del sedimento de la muestra descontaminada.
5. Tapar el tubo y mezclar en vortex.
6. Colocar los tubos en el instrumento BACTEC MGIT.
7. Capturar la información de la muestra en el equipo registrando el nombre del paciente, número de folio, localización del paciente, fecha del cultivo y tipo de muestra, generar las etiquetas correspondientes para identificar los tubos de Lowenstein Jensen.

5.1.2.2 Introducción de los tubos de cultivo al equipo.

Los tubos deben ser introducidos en el instrumento el mismo día en que se descontamina, procesa e inocula la muestra.

1. Antes de introducir los tubos en el instrumento, escanear el código de barras y colocarlo en la estación asignada de acuerdo al procedimiento de introducción de tubos.
2. Si los tubos no son registrados por el escáner antes de introducirse en el instrumento, se convierten en tubos anónimos y serán identificados como "tubos anónimos".
 - a) Introducción de tubos nuevos en el instrumento—Nº de Acceso del código de barras inactivo.

Seguir las siguientes instrucciones para introducir nuevos tubos al equipo:

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 52	De: 114



- 1 Lleve los tubos de cultivos nuevos al instrumento.
Abra el cajón deseado.
- 2 Pulse la tecla de función "introducir tubos".
- 3 El escáner del código de barras se enciende y aparece el icono de código de barras en el centro de la pantalla, que indica que el instrumento está listo para registrar el código de barras del número de secuencia del tubo. Registre por el escáner la etiqueta del código de barras del tubo. (Para registrar por el escáner el código de barras de un tubo, coloque el tubo en el bloque de alineamiento frente al escáner con la etiqueta del código de barras mirando hacia el escáner. Si es necesario, gire el tubo un poco para que el escáner pueda registrar la etiqueta. El sistema emite una alerta para indicar que el código de barras ha sido registrado correctamente.)
- 4 La estación asignada se muestra en el centro de la pantalla (junto con el número de secuencia registrado). Por otro lado, los LED de la estación asignada se iluminan de color VERDE.
- 5 Inserte el tubo en la estación cuidadosa y *completamente*.
- 6 Repita los pasos de 3 a 5 para cada uno de los cultivos nuevos que desea introducir.

NOTA: Cuando los tubos se hayan colocado en las estaciones, no deben ser torcidos ni girados. Los tubos no deben ser descargados salvo en las condiciones siguientes:

- Para extraer un tubo positivo
- Para extraer un tubo negativo
- Para reasignar el tubo si la estación se deteriora

En el caso de presentarse una notificación de tubo anónimo seguir las siguientes instrucciones:

- b) Identificación de tubos anónimos

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 53	De: 114

Un tubo anónimo es un tubo que está colocado en una estación, pero no ha sido asignado a la estación mediante la operación de "introducir tubos" (p. ej., un tubo negativo fuera del protocolo sin extraer). Se notifica la presencia de tubos anónimos de la manera siguiente: aumenta el recuento de tubos anónimos en la zona de resumen de la pantalla y aparece la definición de la tecla de función "identificar tubos anónimos" al abrir el cajón. Es muy importante que cuando el sistema notifica la presencia de tubos anónimos, éstos sean identificados tan pronto como sea posible. El estado de anonimato tiene precedencia sobre todos los demás estados, lo cual significa que los tubos anónimos también pueden ser positivos, fuera del protocolo, en error, etc. Sin embargo, antes de que se muestre ningún otro estado, el tubo anónimo tiene que ser identificado para el sistema.

La función de Identificar los tubos anónimos permite localizar los tubos anónimos en el instrumento y asignarlos a estaciones. Para identificar tubos anónimos—Nº de Acceso del código de barras. Se deben seguir estas instrucciones para identificar tubos anónimos en el instrumento. (Véase la Sección 2.4.2 del manual de usuario MGIT).

- 1 Abra el cajón deseado.
- 2 Pulse la tecla de función "identificar tubos anónimos".
- 3 La primera estación anónima se muestra en el centro de la pantalla y se ilumina el indicador de estación NARANJA. Por otro lado, se enciende el escáner del código de barras y el icono de código de barras aparece en el centro de la pantalla, que señala que el instrumento está listo para registrar el código de barras del número de secuencia del tubo.
- 4 Registre por el escáner la etiqueta del código de barras del tubo. El número de secuencia registrado ahora está asignado a esta estación. Por otro lado,



	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 54	De: 114

los LED de la estación asignada se iluminan de color VERDE.

- Se muestra ahora la siguiente estación anónima en el centro de la pantalla. Repita el paso 4 para cada uno de los tubos anónimos en el cajón. Para los tubos anónimos en los otros cajones, repita el procedimiento desde el paso 1 al 4.

Para identificar tubos anónimos–Código de barras del número de acceso activo. Se deben seguir estas instrucciones para identificar los tubos anónimos en el instrumento si está activa la función de Código de barras del número de acceso (véase a Sección 2.4.2 del manual de usuario MGIT).

- Abra el cajón deseado.
- Pulse la tecla de función "identificar tubos anónimos".
- La primera estación anónima se muestra en el centro de la pantalla y se ilumina el indicador de estación NARANJA. El icono en el centro de la pantalla muestra una flecha que apunta hacia el código de barras superior (el número de secuencia del tubo) y se enciende el escáner del código de barras. Esto indica que el instrumento está listo para registrar el código de barras del número de secuencia de un tubo.
- Registre por el escáner la etiqueta del código de barras del tubo.
- El icono en el centro de la pantalla ahora muestra una flecha que apunta hacia el código de barras inferior (el número de acceso) y permanece encendido el escáner del código de barras. Esto indica que el instrumento está listo para registrar el código de barras del número de acceso. Registre por el escáner la etiqueta del código de barras del número de acceso o pulse la tecla de función "ningún



	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 55	De: 114

código de barras de número de acceso disponible”.

- 6 El número de secuencia registrado ahora está asignado a esta estación. Por otro lado, los LED de la estación asignada se iluminan de color VERDE.


Se muestra ahora la siguiente estación anónima en el centro de la pantalla. Repita los pasos 4 y 5 para cada uno de los tubos anónimos en el cajón. Para los tubos anónimos en los otros cajones, repita el procedimiento desde el paso 1 al Incubación:


- El equipo incubará los cultivos por un periodo de 42 días, periodo en el que se presenten notificaciones de tubo anónimo, tubo negativo y tubo positivo.
- Seguir las siguientes metodologías para el retiro de los tubos:

c) Notificación de la presencia de tubos negativos

Los cultivos que no han dado señal de desarrollo se pueden considerar como negativos en curso (dentro del protocolo) o negativos fuera del protocolo. Estas condiciones se informan de la siguiente manera:



- Negativos en curso—En la zona de resumen de la pantalla, aparece el recuento de los tubos en curso para cada cajón al lado del icono del círculo sólido


- Negativos fuera del protocolo—En la zona de resumen de la pantalla, aparece el recuento de los tubos para cada cajón al lado del icono del círculo sólido con un signo positivo.



5.1.2.3 Extracción de tubos negativos

Los tubos negativos fuera del protocolo pueden extraerse uno por uno o en bloque.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 56	De: 114

Procedimiento:

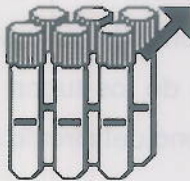


1. Abra el cajón apropiado.
2. Pulse la tecla de función "extraer tubos negativos".
3. Se indican todas las estaciones negativas al concluir el protocolo por la iluminación de los indicadores VERDES INTERMITENTES.



4. El escáner del código de barras se enciende y aparece el icono de código de barras en el centro de la pantalla, que indica que el instrumento está listo para registrar el código de barras del número de secuencia del tubo.

5. Para extraer todos los tubos negativos a la vez (en bloque), pulse la tecla de función "extraer los negativos en bloque". Extraiga todos los tubos de las estaciones indicadas. Se apaga el escáner del código de barras, de modo que no se puede registrar por el escáner ninguna etiqueta del código de barras de los tubos. *No cierre el cajón* hasta que haya descargado todos los tubos de las estaciones indicadas por LED VERDES INTERMITENTES. Cuando se han extraído todos los tubos negativos, pulse la tecla de función "aceptar". Asegúrese de extraer todos los tubos de las estaciones con LED VERDES INTERMITENTES; todos los tubos que quedan en el cajón se convertirán en tubos anónimos en el siguiente análisis del cajón y será necesario identificarlos antes de poder extraerlos. Una vez que han sido identificados, son tratados como tubos introducidos nuevamente.



6. Para extraer los tubos negativos uno por uno, extraiga los tubos que desea extraer y registre por el escáner sus etiquetas del código de barras. Continúe el registro y extraiga uno por uno todos los tubos negativos.
7. Cuando se han extraído todos los tubos negativos, el instrumento pita tres veces y aparece el icono "aceptar" en el centro de la pantalla.

5.1.2.4 Extracción de los tubos en curso

De vez en cuando, puede ser necesario extraer del instrumento uno o más tubos en curso (en protocolo). Si utiliza la operación "extraer tubos en curso", puede extraer los tubos en curso sin originar un error en la estación asignada. Al igual que en la operación "extraer los tubos negativos", cualquier tubo extraído es eliminado de la base de datos y no puede ser reintroducido como un cultivo en curso. (Si se vuelve a introducir un tubo en curso que ha sido extraído, el sistema lo trata como un tubo nuevo.) Si hay que extraer un tubo en curso y va a volver a introducirlo pronto, puede ser preferible simplemente extraer el tubo físicamente de la estación, dejar que la estación indique un error, reintroducir el tubo tan pronto como sea posible y resolver el error de la estación.

Procedimiento:

Para extraer un tubo en curso

1. Abra el cajón apropiado.
2. Pulse la tecla de función "extraer tubos en curso".
3. Se iluminan Los indicadores NARANJAS INTERMITENTES de la estación en curso que tiene mayor antigüedad. Por otro lado, aparece una pantalla similar a la siguiente (que muestra la misma estación señalada por los indicadores intermitentes):



#1	10/16/98 16:08	 A / S20	0 0 0 0 1 0	(A) 0 0 0 0 1 0 0 3 1 0	(B) 0 0 0 0 0 0 0 3 2 0	(C) 0 0 0 0 0 0 0 3 2 0
	A/F07 444498765107		32:00:00 0			

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 58	De: 114

La información que aparece en el centro de la pantalla incluye el número de la estación, el código de barras del número de secuencia, el número de acceso (si es aplicable), el tiempo del protocolo y la unidad de crecimiento actual.

4. El escáner del código de barras se enciende y aparece el icono de código de barras en el centro de la pantalla, que indica que el instrumento está listo para registrar el código de barras del número de secuencia del tubo.
5. Si la estación de donde desea extraer el tubo en curso es la estación mostrada, extraiga el tubo y registre por el escáner el código de barras del número de secuencia. Si ésta no es la estación correcta, utilice las teclas de FLECHA ARRIBA o FLECHA ABAJO para mostrar la lista de las estaciones en curso hasta que aparezca la estación deseada. A continuación, extraiga el tubo deseado y registre por el escáner el código de barras de su número de secuencia.
6. Repita el paso 5 para cualquier otro tubo en curso que desea extraer.




Si el sistema indique por medio de una luz roja constante, en uno de los módulos del equipo una ubicación particular indica un tubo positivo, seguir las instrucciones correspondientes para retirar el cultivo positivo:

d) Notificación de la presencia de tubos positivos.

El sistema notifica de la presencia de cultivos positivos de varias formas:

- Se ilumina el indicador luminoso POSITIVO en la parte anterior del cajón
- En la pantalla de resumen (parte superior derecha), aparece el recuento de los tubos en cada cajón al lado de un círculo que contiene un icono con el signo más



 	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS	 INER	MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 59	De: 114

- Cuando el cajón se abre, aparece la tecla de función “extraer tubos positivos” en la zona de definiciones de las teclas de función de la pantalla (véase abajo).
- Hasta que se acepte la condición, suena el aviso acústico (si está activo)

5.1.2.5 Extracción de tubos positivos

1. Pulse la tecla SILENCIAR ALARMA para silenciar la alarma acústica. Abra el cajón apropiado.
2. Pulse la tecla de función “extraer tubos positivos”.
3. Se iluminan todas las estaciones positivas con indicadores VERDES INTERMITENTES y ROJOS INTERMITENTES. Extraiga uno de los tubos positivos.
4. El escáner del código de barras se enciende y aparece el icono de código de barras en el centro de la pantalla, que indica que el instrumento está listo para registrar el código de barras del número de secuencia del tubo. Registre por el escáner la etiqueta del código de barras del tubo positivo. Se apagarán los LED de esta estación.
5. Repita los pasos 4 a 5 para extraer los otros tubos positivos. El indicador POSITIVO en la parte delantera del cajón (y en la parte superior del instrumento) no se apagará hasta que se hayan extraído todos los tubos positivos.
6. Cuando se han extraído todos los tubos positivos, el instrumento pita tres veces, se apaga el escáner del código de barras y aparece el icono “aceptar” en el centro de la pantalla.
7. Todos los tubos positivos por el instrumento deben permanecer a temperatura ambiente cuando están fuera del instrumento.



5.1.2.6 Reintroducción de los tubos positivos en el instrumento para seguir el protocolo.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 60	De: 114

El sistema permite la reintroducción de los tubos que son positivos por el instrumento durante un intervalo de hasta cinco horas después de su extracción. Aunque el intervalo para la reintroducción se prolonga hasta cinco horas, los tubos deben ser reintroducidos en el instrumento tan pronto como sea posible. Los tubos deben permanecer a temperatura ambiente cuando están fuera del instrumento.

La función de reintroducción reinicia las rutinas de positividad, retiene la fecha de comienzo del protocolo y continúa el análisis del tubo como un cultivo en curso. Si el tubo no es reintroducido dentro del intervalo de reintroducción de cinco horas, se eliminan todos los datos previos.

Para volver a introducir en el instrumento un tubo positivo descargado para seguir el análisis, abra la puerta. Pulse la tecla de función "introducir tubos". A continuación registre por el escáner la etiqueta del código de barras del tubo. Coloque el tubo en la estación indicada (que puede ser diferente de la estación original). Los datos previos se retienen sólo si se cumplen las siguientes circunstancias:

- El tubo se vuelve a introducir en el intervalo de tiempo preciso
- La etiqueta del código de barras del número de secuencia se registra por el escáner para reintroducir el tubo
- El tubo se vuelve a introducir en el mismo instrumento de donde fue extraído

Si no se utiliza la operación "introducir tubos" para reintroducir el tubo, se convierte en un tubo anónimo en el siguiente ciclo de análisis del cajón y se eliminan de la base de datos los resultados previos del análisis si el tubo no es identificado en el intervalo de 5 horas. Si un tubo no se reintroduce dentro del intervalo de reintroducción, puede ser introducido (o identificado) como un cultivo nuevo y la duración del protocolo puede ser reducida al número de días que restaban para completar el protocolo de análisis original. Si el protocolo se cambia para un tubo

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 61	De: 114

reintroducido, asegúrese de volver a fijar el protocolo en el valor establecido en su laboratorio (valor recomendado de 42 a 56 días).

5.1.3 Informes preliminares del cultivo:

CULTIVOS NEGATIVOS

1. Es aquel cultivo que no presenta desarrollo de micobacterias.
2. Después de concluido el tiempo de incubación de los cultivos se revisan visualmente todos los tubos negativos. Si el tubo no muestra ningún indicio de desarrollo, el tubo debe ser esterilizado antes de ser desechado.
3. Al final del periodo de incubación (42 días) se debe realizar frotis a aquellos cultivos que presenten las siguientes características:
 - Cultivos con baciloscopía positiva
 - Cultivos con desarrollo en LJ
 - Cultivos que se hayan sembrado únicamente en medio líquido.
4. Realizar un frotis y teñir por Z-N (ver procedimiento General de Tinciones PROM-07) para la detección de bacilos ácido alcohol resistentes y realizar un subcultivo para su identificación y sensibilidad.

CULTIVOS POSITIVOS:

1. Son aquellos cultivos que presentan desarrollo de micobacterias.
2. Si el equipo detecta un tubo de cultivo positivo realizar la tinción de Zeehl Neelsen y control de pureza en gelosa sangre de carnero, si el resultado es positivo, concentrar la muestra y realizar una resiembra en un tubo de LJ y un tubo de medio de Sonbrik para realizar la prueba de identificación manual y automatizada.

CULTIVOS CONTAMINADOS.

En caso de contaminación por bacterias, la muestra se deberá descontaminarse nuevamente de acuerdo al punto 1.1 del procedimiento de descontaminación. Si la contaminación observada es por hongos,

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 62	De: 114

desechar el frasco y esperar el resultado final de uno de los medios utilizados para finalizar el cultivo. Si ambos medios están contaminados con desarrollo de hongos, referir el cultivo al área de micología y solicitar nueva muestra para micobacterias.

5.1.4 Control de calidad del tubo de cultivo MGIT:

Al recibir un nuevo lote de tubos MGIT es necesario verificar el adecuado funcionamiento de los tubos probando el desarrollo de las siguientes cepas control ATCC:

Especie	No. Atcc	Dilución de la suspensión 0.5 de Macfarland en solución salina	Días de positividad en el equipo
<i>M. tuberculosis</i>	27294	1:500	6-10
<i>M. kansas</i>	12478	1:50000	6-11
<i>M. fortuitum</i>	6841	1:5000	1-3

1. Resembrar las cepas antes señaladas en medio sólido de menos de 15 días de desarrollo.
2. Prepare una suspensión de la cepa tipo en Caldo Middlebrook 7H9.
3. Deje reposar la suspensión durante 20 minutos.
4. Transfiera el líquido sobrenadante a un tubo vacío y estéril y déjelo reposar 15 minutos más.
5. Transfiera el líquido sobrenadante a otro tubo vacío y estéril.
6. Ajuste la suspensión al 0.5 de Mc Farland.
7. Diluya las suspensiones de organismos de control de acuerdo a la tabla anterior.
8. Inocule los tubos MGIT conforme al procedimiento de "Inoculación de los tubos MGIT".
9. El instrumento debe detectar los tubos MGIT como positivos en el plazo de tiempo indicado en la tabla anterior.
10. Si los tubos de control de calidad MGIT no producen los resultados esperados, no debe utilizar los tubos restantes informar a la jefatura de la anomalía.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 63	De: 114

Si no están presentes otros microorganismos: Vuelva a poner el tubo en el instrumento como tubo negativo dentro de 5 h de la extracción. Permita que el tubo complete el procedimiento de análisis: No hay resultado comunicable.

5.2 Procedimiento para la identificación de micobacterias.

Procedimiento general.

A continuación se describe una metodología básica para la diferenciación de las micobacterias que incluye algunas pruebas enzimáticas tanto por método manual como por método automatizado.

- Este procedimiento se deberá realizar al menos dos veces por semana.
- Cuando el cultivo es positivo por el método de medio líquido y su confirmación por la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes por la tinción de ZN del cultivo, los tubos se agitan en el vórtex por espacio de 2-3 minutos, se saca todo el líquido y se vacía en tubo de vidrio de 16X125mm previamente identificado con el número de folio. Centrifugar a 3000 g. por 20 minutos y una vez centrifugado, desechar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril dejando aproximadamente 2 a 3ml de sedimento, agitarlo en el vórtex y poner 5 gotas en un medio de LJ y 5 gotas en un medio de LJ con piruvato (Incubar a 35° C y 5% de CO₂). Posteriormente se realiza la identificación por sondas de DNA (ver punto 2.2 de este procedimiento) para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, la identificación final de la cepa se realiza cuando se obtiene el desarrollo del aislado en medio sólido de Lowenstein–Jensen y se lleva a cabo la prueba de niacina, nitratos, catalasa a 68° C y pirazinamidasas en tubo, estas pruebas son importantes para la determinación de *Mycobacterium tuberculosis* (Ver punto 2.1.1).
- Si ambas pruebas son positivas la cepa problema se identifica como *Mycobacterium tuberculosis* y realizar la prueba de sensibilidad automatizada descrita en el punto 2.4.
- Si ambas pruebas son negativas la cepa problema se identifica como una cepa de micobacteria no tuberculosa realizándose un proceso diferente para su identificación (Ver punto 2.1.2 y Tabla N° 1), también se identifican por medio de sondas de DNA (Ver procedimiento en el punto 2.2) para el

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 64	De: 114

complejo *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium gordonae*.

- Las cepas de bacterias no tuberculosas aisladas de biopsias, hemocultivos, LCR y LP enviarlas a la sección de PCR para realizar la identificación por hp65.
- Las cepas de micobacterias atípicas aisladas de muestras de expectoración, LBA, AB y orinas solicitar nueva muestra para confirmar el resultado y enviar a PCR las que tengan 2 o más muestras.

5.2.1 Identificación manual por pruebas bioquímicas

5.2.1.1 Primer Nivel de Diferenciación:

Morfología colonial:

- Medio de Lowenstein-Jensen: Colonias típicas blancas a color crema, de aspecto rugoso a seco, que con el tiempo toman forma de coliflor. Se desarrollan en la superficie del medio y el sitio en el que se implantan no cambia de color. El crecimiento es eugónico.

Morfología celular:




- Bacilos de longitud mediana que miden 2 a 6 x 0.3 μm . Generalmente son de forma ligeramente curva, en cultivo, los bacilos en ocasiones forman cordones serpentina que tienden a ser extensos.

Velocidad de Desarrollo:

- Se prepara una suspensión de bacilos y se ajusta su turbidez con la del tubo 1 del nefelómetro de Mac Farland.
- A partir de esa suspensión se hacen diluciones decimales 10-1 y 10-2. Con la dilución de 10-2 se siembran 100 μl en cinco tubos con medio de cultivo y se incuban en las siguientes condiciones:

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 65	De: 114

- Un tubo con medio de LJ que se incubaba a 20-25°C (Temp., ambiente).
- Un tubo con medio de LJ que se incubaba a 42°C.
- Dos tubos con medio de LJ uno se envuelve con papel de aluminio o papel negro y se incubaba a 35°C en una atmósfera 5% de CO₂.
- Un tubo de LJ con piruvato se incubaba a 35°C en una atmósfera 5% de CO₂.
- Los tubos se revisan a los 7, 15, 30 y 60 días. Se anota el día de la aparición de las colonias, su aspecto, pigmento y las temperaturas a las cuales hubo desarrollo. Si hay suficiente crecimiento a 28-30 días se procede a realizar las pruebas enzimáticas y de foto cromogenicidad.
- Si se observa pigmentación en los dos tubos el cubierto y el no cubierto incubado a 35°C se trata de una micobacteria escoto cromógena.
- Si no hay pigmentación en ninguno de los tubos incubados a 35°C se puede efectuar la prueba de la foto cromogenicidad exponiendo los tubos a la luz de una lámpara de 50 watts a 50cm de distancia durante una hora y se incuban nuevamente hasta el día siguiente y se compara la coloración de los tubos.
- Si se observa aparición de pigmento en los tubos expuestos a la luz, la cepa es foto cromógena, si no hay pigmentación en ninguno de los tubos, la cepa no es cromógena. Los cultivos deben ser jóvenes para que sea válida la prueba.
- Desarrollo a temperatura ambiente en menos de 7 días grupo IV de Runyon, micobacterias de rápido desarrollo. Desarrollo lento: si se desarrolló mejor a 30-33°C y la muestra proviene de biopsia de piel, es conveniente realizar otras pruebas enzimáticas a fin de diferenciar *M marinum*, especie patógena aislada de granuloma de piel.

 	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 66	De: 114

- Si se desarrolló mejor a 35°C, se pueden diferenciar dentro de 3 grupos de Runyon:

Foto cromógena	Grupo I de Runyon
Escoto cromógena	Grupo II de Runyon
No cromógena	Grupo III de Runyon

- Se deben realizar, además de las pruebas ya descritas, otras que deben ser efectuadas en cultivos recientes, nunca en cultivos de más de 30 días:

- Reducción de nitratos
- Actividad de catalasa a temperatura ambiente y a 68°C
- Hidrólisis de Tween 80
- Sensibilidad al TCH

- Otras pruebas que se utilizan en los laboratorios de referencia son:

- Reducción del telurito
- Crecimiento en NaCl al 5%
- Crecimiento en medio de MacConkey sin cristal violeta
- Captura de hierro, presencia de arilsulfatasa,
- Ureasa,
- β -glucosidasa y
- β -galactosidasa.

Características fisiológicas:

- Acumulación de niacina: Es POSITIVA para *M tuberculosis*, sin embargo también sucede con *M simiae* y algunas cepas de *M marinum* y *M chelonae*, ya que todas comparten la ausencia de la enzima que convierte la niacina en niacina-ribonucleótido.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 67	De: 114

- Reducción de nitratos a nitritos: Es **POSITIVO** en *M tuberculosis*, pero también lo es en otras como *M kansasii*, *M szulgai* y *M fortuitum*.
- Actividad de la catalasa: La catalasa de *M tuberculosis* presenta **TERMOLABILIDAD POSITIVA**, lo cual también ocurre en *M bovis* y *M gastri*.
- Sensibilidad a la hidrazida del ácido tiofen-2-carboxílico (TCH): *M tuberculosis* es **RESISTENTE**, por lo cual la bacteria se desarrolla bien en su presencia.
- Desaminación enzimática de la pirazinamida : **POSITIVA** para *M tuberculosis*

Prueba de Niacina:

La niacina (ácido nicotínico) es un producto del metabolismo de la biosíntesis del glicerol y el ácido aspártico, por todo el género *Mycobacterium*; sin embargo, algunas especies (entre ellas *M. tuberculosis* y algunas cepas de *M. bovis*) carecen de la enzima responsable de degradar este compuesto hasta el complejo ribonucleótido-niacina, por lo que lo acumulan en el medio de cultivo como un compuesto soluble en agua.

El ácido nicotínico reacciona con bromuro de cianógeno, en presencia de una amina primaria, formando un compuesto de color amarillo o rosa dependiendo si es utilizada la bencidina.

Procedimiento:

- Se toma un tubo del cultivo problema con abundante desarrollo colonial de no menos de 4 semanas de desarrollo y se le agrega 1 ml de agua destilada estéril
- Simultáneamente se deberán incluir los siguientes controles cada que se realice la prueba:

POSITIVO: Cultivo conocido presuntamente *M tuberculosis*.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 68	De: 114

NEGATIVO: Tubo con agua estéril.

- El medio se rompe con un aplicador de madera a fin de facilitar la difusión de la niacina.
- El tubo se deja inclinado durante 18 a 24 horas a 35° C.
- Posteriormente se extrae el líquido con una pipeta Pasteur provista de Pro pipeta, se pasa a un tubo limpio y se agregan 0.5 ml. de una solución de bromuro de cianógeno y 0.5 ml de solución alcohólica de bencidina al 4% (o anilina).
- Al finalizar la prueba debe agregarse a los tubos una solución de hidróxido de sodio al 4%, ya que el bromuro de cianógeno en presencia de ácido, se convierte en ácido cianhídrico que es muy tóxico.

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: La prueba es positiva cuando se detecta la presencia de una coloración rosa. Las cepas niacina positiva se informan como *M tuberculosis*.
- Prueba Negativa: La prueba es negativa cuando no se detecta cambio de color en el medio a evaluar. Las cepas niacina negativa que se hayan desarrollado en los tubos de prueba se informan como cepas de micobacterias atípicas.

5.2.1.2 Segundo Nivel de Diferenciación de Micobacterias

Además de las pruebas ya descritas se realizan las siguientes pruebas enzimáticas, las que deben ser efectuadas en cultivos recientes, nunca en cultivos de más de 30 días.

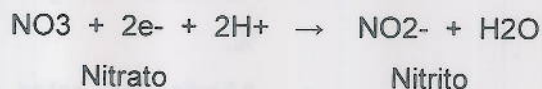
Reducción de nitratos (Prueba de Virtanen)

La reducción del nitrato (NO₃) en nitrito (NO₂) y en gas nitrógeno, tiene lugar generalmente en condiciones anaeróbicas, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como aceptor de H⁺ y la mayoría de las bacterias aerobias

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 69	De: 114

sólo pueden reducir el nitrato en ausencia de oxígeno, en la reducción del nitrato los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculas aceptoras específicas.

Algunas especies del género *Mycobacterium* presentan la enzima nitrato reductasa que es la responsable de la reducción de nitratos a nitritos, a través de esta prueba se determina si el microorganismo es capaz de esta reducción.





Los nitritos presentes en el medio se detectan al agregar sulfanilamida y α -naftilendiamina a pH ácido, esto da la formación de un color rojo debido a una sal de diazonio.

Preparación:

- Sustrato 0.01M de nitrato de sodio en 0.022M de buffer de fosfato, pH-7.0.
 - NaNO₃ 0.085 g.
 - KH₂PO₄ 0.117 g.
 - Na₂HPO₄ 0.485 g. = (0.1956 g.) del que no tiene 12 H₂O.
 - H₂O dest. 100 ml.
1. Colocar
 2. Reactivo No. 1: Añadir 50 ml de HCl concentrado a 50 ml de agua destilada.
 3. Reactivo No. 2: Disolver 0.2 g de sulfanilamida ó ácido sulfanílico a 100 ml de agua destilada.
 4. Reactivo No. 3: Disolver 0.1 g de dihidrocloruro de N-naftilendiamina en 100 ml de agua destilada.
 5. Almacenar los reactivos a 4°C y en oscuridad, si se forman precipitados ó algún color desechar.

Procedimiento:

- Colocar de 3 a 4 gotas de agua destilada estéril en tubos de 16 x 125 Mm con tapa de rosca.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 70	De: 114

- Introducir un inóculo cargado de masa bacilar en cada tubo, tratando de homogenizar la mezcla.
- Agregar 2 ml de nitrato de sodio M/100 en amortiguador de fosfatos M/45, pH 7. Agitar e incubar a 37 ° C por 2 h.
- Agregar una gota de una solución de Ac. clorhídrico 1:2 y agitar suavemente.
- Adicionar dos gotas de una solución de sulfanilamida al 0.2 %.
- Añadir dos gotas de una solución de Hidrocloruro de n-naftilendiamina al 0.1 %.
- Incluir cada que se realice la prueba un control positivo:
POSITIVO: *M tuberculosis*
NEGATIVO: Sólo reactivos

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: la prueba es positiva si se desarrolla color rojo. Puede variar desde el rosado al rojo intenso (de 1+ a 5+)
- Prueba Negativa: no hay desarrollo de color.

Actividad de catalasa a temperatura ambiente y a 68° C.

La catalasa es una hemo enzima que pertenece al grupo de las ferro-porfirinas, estas presentan un hemo como grupo prostático. Esta enzima se encuentra en organismos que tienen el sistema citocromo y que son capaces de utilizar el oxígeno como aceptor final al H⁺, de esta manera se reduce la molécula de O₂ a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de carbohidratos. La catalasa está presente en las bacterias aerobias y funciona para catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno que se encuentra en exceso, ya que éste es tóxico para la célula.



	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 71	De: 114

Para la observación de esta enzima en micobacterias se procede de dos formas una es determinar si la enzima es termoestable o no y la catalasa semi cuantitativa que significa medir la columna de burbujas que se producen. Además de que sirve para identificar cepas resistentes a isoniazida (INH), ya que se conoce que una delección del gen responsable de la catalasa (*katG*) suele implicar la adquisición de resistencia a este antifímico.

CATALASA 68 ° C

Reactivos:

- Buffer de fosfatos 0.067M, pH= 7
- ml de Na₂HPO₄ (9.47 g / l)
- 38.9ml de KH₂PO₄ (9.07g/l)
- Una mezcla de Tween 80 al 10% y H₂O₂ al 30% (fresca).

Procedimiento:

- Distribuir en tubos de 12 x 75mm. 0.5ml de la solución amortiguadora pH 7 por tubo. Emplear dos tubos para cada cepa.
- Inocular cada tubo con un inóculo denso de la cepa a evaluar. Dejar uno a temperatura ambiente. Colocar el otro tubo en baño maría a 68°C por 20 min.
- Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Preparar una mezcla en partes iguales de la solución de Tween 80 al 10 % y el peróxido de hidrógeno al 30 % y agregar 0.5 ml de este reactivo a cada tubo. Esta mezcla se debe preparar en el momento de ser usada.

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: *M tuberculosis* (positiva a temperatura ambiente), *M fortuitum* o *M phlei* (positiva a temperatura ambiente y a 68° C)

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 72	De: 114

- Prueba Negativa: *M. tuberculosis* a 68 ° C

Prueba de la catalasa Semicuantitativa:

Virtualmente todas las micobacterias poseen la enzima capaz de degradar el peróxido de hidrógeno excepto *M. gastri*, algunas cepas mutantes de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. kansasii*. Las especies de micobacterias pueden distinguirse por sus diferencias cuantitativas en la actividad de la catalasa y por diferencias en su termo estabilidad.

Procedimiento:

- Inoculo: utilizar un caldo de cultivo de 7 días o una suspensión celular con una turbidez comparable.
- Preparar una mezcla fresca de Tween 80 al 10 % y peróxido de hidrógeno al 30 %
- Preparar medio de LJ en posición vertical
- Inocular un medio de cultivo con 0.2 ml de la suspensión bacteriana,
- Incubar por 2 semanas a 35 ° C con el tapó del tubo un poco abierto
- Añadir 1ml de la mezcla de tween-peróxido y dejar el tubo a temperatura ambiente por 5 min. y observar la producción de burbujas.
- Esperar un tiempo de 20 min. antes de descartarlas como negativas.
- Incluir un control positivo y un control negativo cada que se realice la prueba:
 - Control positivo: *M. kansasii*
 - Control Negativo: *M. tuberculosis*

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 73	De: 114

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: Producción de Burbujas > 45 Mm al revelar la prueba
- Prueba Negativa: < 45 Mm de producción de Burbujas al revelar la prueba

Prueba de hidrólisis de Tween 80 (método de Wayne)

Algunas especies del género *Mycobacterium* producen lipasas capaces de degradar al detergente polioxietilén sorbitol mono-oleato (Tween 80), las lipasas descomponen al Tween 80 en ácido oleico y sorbitol polioxietileno, al haber degradación el medio se torna de un color rojo oscuro debido a la separación del Tween 80 del rojo neutro.

Reactivos:

- 100 ml. de Buffer de fosfatos 0.15 M
 - Na₂HPO₄ - 2.129 g.
 - KH₂PO₄ - 2.041 g.
- 0.5 ml de Tween 80
- 2.0 ml de una solución acuosa de rojo neutro al 0.1%
- pH 6.8 - 7

Procedimiento:

- Repartir 2 ml del sustrato en tubos de 13 x 100 con tapón de rosca.
- Esterilizar a 121°C por 10 min. después de esterilizado el reactivo debe de presentar una coloración paja o ámbar. Guardarlo en la oscuridad a 4°C por no más de dos semanas.
- Inocular el sustrato con un inóculo denso de la cepa.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 74	De: 114

- Incubar de 35 a 37°C hasta por 12 días, hacer lecturas a las 24 hrs., 5 días y hasta 10 a 12 días.
- Revisar los tubos los tubos a 1, 5 y 10 días para observar los cambios de color de rosa a rojo. No agitar los tubos.
- Incluir dos controles cada que se realice la prueba:
POSITIVO: *M kansasii*
NEGATIVO: Sólo reactivos

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: aparición de color rosa a rojo antes de 5 días y de 5 a 10 días.
- Prueba Negativa: sin cambio de color después de 10 días.

Prueba de Arilsulfatasa (prueba de 3 días):

La arilsulfatasa es una enzima producida por ciertas especies de micobacterias, ésta provoca que se libere fenoltaleína al romper el enlace existente entre el grupo sulfato y el anillo aromático del disulfato tri potásico de fenoltaleína. La presencia de la fenoltaleína libre se observa al agregar una base al medio de cultivo, lo que origina la formación de un color rosa.

La prueba de 3 días se utiliza principalmente para identificar micobacterias de rápido crecimiento de importancia clínica. La prueba de 14 días es utilizada para la diferenciación de micobacterias de lento crecimiento.

Sustrato:

100 ml. de agar base dubos oleico.

1 ml. de glicerol.

65 MG. de tri potasio de fenoltaleína disulfuro.

pH 6.8 a 7.0

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 75	De: 114

Reactivo:

10.6 g. Na₂CO₃ en 100 ml. de agua destilada.

Procedimiento:

- Incorporar 1 ml de glicerol y 65 mg de disulfato de fenofaleína tri potásica a 100 ml de base de agar Dubos oleico.
- Colocar 2 ml de esta mezcla en tubos con tapón de rosca
- Esterilizar y permitir que el medio solidifique en posición vertical.
- Utilizar como Inoculo una suspensión ligeramente turbia.
- Inocular el medio con 50 µl de suspensión bacilar.
- Incubar a 35 ° C por 3 días para micobacterias de rápido crecimiento y 14 días para micobacterias de lento crecimiento.
- Preparar una solución de Na₂CO₃ 1 M(10.6 g en 100 ml de agua)
- Añadir 1 ml de la solución de Na₂CO₃
- Incluir controles positivo y negativo cada que se realice la prueba:
 - Control Positivo: *M. fortuitum*
 - Control Negativo: *M. avium*

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: se observa la aparición de un color rosa.
- Prueba Negativa: no se observa el cambio de color de la prueba.

Crecimiento en Agar Mac Conkey sin Cristal Violeta:

Es utilizado para distinguir a las micobacterias de rápido crecimiento que son potencialmente patógenas. Muchos aislados del complejo *M. fortuitum* crecen en este medio, mientras que los

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 76	De: 114

aislados de cepas no patógenas (generalmente no pigmentadas) no crecen.

Procedimiento:

- Preparación del medio de cultivo de acuerdo a las especificaciones del fabricante (15 ml por placa).
- Inoculo: un caldo de cultivo con 7 a 10 días de incubación.
- Inocular una placa del agar tomando el inóculo del caldo con una asa estéril, estriar para obtener colonias aisladas
- Observar el crecimiento de 5 a 11 días.
- Incluir un control positivo y un control negativo:
 - Control Positivo: *M. fortuitum*
 - Control Negativo: *M. tuberculosis*

Interpretación de la prueba:

- Solamente las cepas del complejo *fortuitum–chelonei* crecen hasta el final de la estría. Otras micobacterias pueden mostrar crecimiento donde el inoculo es más cargado.

Prueba Toma de Hierro:

Esta prueba se utiliza para detectar micobacterias de rápido crecimiento capaces de convertir el citrato férrico amoniacal en óxido de hierro.

Procedimiento:

- Inoculo: Suspensión Acuosa.
- Inocular un medio de LJ con 100µl de la suspensión de la cepa.
- Incubar el tubo a 35°C hasta que aparezca el crecimiento definido (2-3 semanas).
- Preparar tubos con citrato férrico amoniacal al 20%. esterilizar

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 77	De: 114

- Añadir una gota de la solución de citrato estéril por cada ml. de medio de LJ (15 gotas).
- Incubar a 37 ° C por 21 días
- Incluir un control positivo y un control negativo cada que se realice la prueba:
 - Control Positivo: *M. fortuitum*
 - Control Negativo: *M. chelonae*

Interpretación de la Prueba:

- Prueba Positiva: el óxido de hierro se observa como un color café oscuro (óxido) y decoloración del medio.
- Prueba Negativa: no se observa cambio de color en el medio de cultivo.

Prueba de Pirazinamidasa:

La enzima pirazinamidasa hidroliza la pirazinamida a ácido pirazinoico y amonio. Este ácido se detecta por la adición de sulfato ferroso amoniacal en el medio de cultivo. Esta prueba es útil para separar *M. marinum* de *M. kansasii* y *M. bovis* de *M. tuberculosis*.

Procedimiento:

- Inoculo: cultivo con 2 a 3 semanas de crecimiento.
- Preparar tubos con caldo de base Dubos con 0.1g se pirazinamida, 2g de ácido pirúvico y 15 g de agar/L, adicionar 15 ml a cada tubo c/tapón de rosca. Esterilizar y solidificar en posición vertical.
- Sembrar el agar agregando un inóculo fuerte del cultivo a probar.
- Incubar a 35°C por 4 días.
- Preparar una solución de sulfato ferroso amoniacal al 1% recién preparado.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 78	De: 114

- Añadir 1ml de sulfato ferroso amoniacal a los tubos y colocarlos en el refrigerador por 4h.
- Incluir un control positivo y un control negativo cada que se realice la prueba:
 - Control Positivo: *Mycobacterium tuberculosis*
 - Control Negativo: medio no inoculado.

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: desarrollo de una banda de color rosa indica un resultado positivo de la prueba.
- Prueba Negativa: no se desarrolla cambio de color en el tubo.

Prueba de Tolerancia al Cloruro de Sodio:

De las micobacterias de lento crecimiento, solamente *M. triviale* crece en presencia de NaCl al 5%. Las micobacterias patógenas de rápido crecimiento, excepto *M. mucogenicum* y muchos aislados de *M. chelonae*, crecen también en NaCl al 5%.

Procedimiento:

- Inoculo: una suspensión turbia.
- Utilizar LJ conteniendo NaCl al 5%.
- Utilizar como control de crecimiento el mismo medio de LJ sin cloruro de sodio.
- Inocular el medio con 0.1ml de la suspensión bacteriana.
- Incubar el cultivo a 35°C y leer a la 4° semana.
- Incluir un control positivo y un control negativo cada que se realice la prueba:
 - Control Positivo: *M. fortuitum*
 - Control Negativo: *M. tuberculosis*

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 79	De: 114

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: se observa desarrollo de micobacterias en el medio.
- Prueba Negativa: no se observa desarrollo de micobacterias en el medio.

Prueba de Reducción de Telurito:

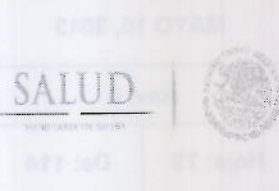

La telurita reductasa reduce el telurito de potasio incoloro a un precipitado negro metálico en un periodo de 3 a 4 días, y es una propiedad que distingue a las cepas del complejo *M. avium*, así como también a las micobacterias de rápido crecimiento.

Procedimiento:

- Inoculo: utilizar cultivos de 7 días crecidos en caldo Middlebrook 7H9. El caldo debe presentar una turbidez evidente que indique un crecimiento activo.
- Preparar tubos con una solución acuosa de telurito de potasio al 2 % (0.1 g en 50 ml de agua). Esterilizar a 121 ° C por 10 min.
- Añadir 2 gotas de la solución de telurito a cada cultivo y regresar los cultivos al incubador.
- Examinar los cultivos diariamente por 4 o más días
- Incluir un control positivo y un control negativo cada que se realice la prueba:
 - Control Positivo: *M. avium*
 - Control Negativo: *M. kansasii*

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: se observa la presencia de un precipitado negro azabache en el cultivo.
- Prueba Negativa: no se observa la presencia de un precipitado de color negro

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 80	De: 114

Prueba de Ureasa:

Se basa en la habilidad de un aislado para hidrolizar la urea en amoníaco y CO₂, se utiliza para identificar tanto micobacterias escoto cromógenas como no foto cromógenas. La urea es útil para reconocer cepas pigmentadas de MAC.

Procedimiento:

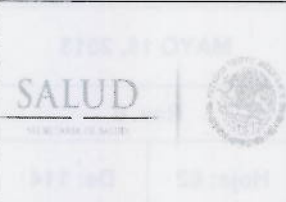

- Inoculo: colonias en medio sólido en crecimiento activo.
- Preparar tubos de vidrio con tapón de rosca con 4 ml de agar base urea estéril (Mezclar 1 parte de la base agar urea concentrada con 9 partes de agua desionizada estéril, esterilizar por filtración).
- Agregar las colonias a un tubo con el sustrato.
- Incubar a 35 ° C por más de 3 días
- Incluir un control positivo y un control negativo cada que se realice la prueba:
 - Control Positivo: *M. fortuitum*
 - Control Negativo: *M. gordonae*

Interpretación de la prueba:

- Prueba Positiva: Cambio de color del medio de naranja a rosa intenso.
- Prueba Negativa: Sin cambio de color.

Sensibilidad a hidrazida del ácido tiofén-2-carboxílico (TCH)

La inhibición del crecimiento por la hidracida del ácido Tiofén-2-carboxílico (T2H), es una prueba útil para distinguir entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Este compuesto inhibe el crecimiento de *M. bovis* sin afectar el crecimiento de *M. tuberculosis* a concentraciones de 5 µg/ml en el medio de cultivo.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 81	De: 114

Sustrato

- En el medio Middlebrook 7H11 se le agregan 5 µg/ml de T2H en tubos de 16 X 150.
- Preparar el mismo medio sin T2H como control.

Procedimiento:

- Preparar una suspensión turbia de las cepas problema en agua destilada estéril.
- Diluir 1:1000 e inocular tres gotas de la suspensión en el medio control y en el medio con T2H.
- Incubar a 37° C y registrar la fecha en la que se observa un crecimiento definido en el medio control. Incubar el medio con T2H hasta que aparezca crecimiento y hasta un máximo de 3 semanas.

Interpretación:

- **RESISTENTE:** Si el crecimiento en el medio de T2H es mayor al 1% que el crecimiento en el medio control.
- **SENSIBLE:** (*M bovis*) si el crecimiento en el medio con TCH es menor del 1%, comparado con el crecimiento en el testigo.

Después de realizar las pruebas de identificación se reporta el resultado conforme al cuadro # 1, Pruebas de identificación de micobacterias el cual se encuentra en el área de Micobacterias y al final de este procedimiento, en la libreta asignada para el registro del área de Micobacterias PROM12-A, la cual se muestra a continuación:

					PROM12-A
# Folio	Nombre Paciente	Expediente	Procedencia	Edad	Tipo muestra
Fecha		Baciloscopia		Diagnostico	

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 82	De: 114

Donde:

Folio: anotar el número de folio del paciente

Nombre paciente: anotar el nombre del paciente empezando por apellido

Expediente: anotar el número de expediente del paciente

Procedencia: anotar la procedencia del paciente

Edad: anotar la edad del paciente

Tipo muestra: anotar el tipo de muestra

Fecha: anotar la fecha en se recibió la muestra

Baciloscopia: anotar la tinción que se realizo

Diagnostico: anotar el diagnostico del paciente

5.2.2 Identificación por método automatizado (identificación por sondas de DNA GEN PROBE).

Es un método de identificación rápida por sondas de DNA que utiliza la técnica de hibridación de ácidos nucleicos para la identificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, micobacterias del complejo *M. avium* entre otras micobacterias, aisladas a partir de cultivo.

Procedimiento:

5.2.2.1 Preparación de la muestra:

- Cepas aisladas de medio sólido de LJ, placas de Middlebrook 7H10 o 7H11 y/o cultivo líquido de 3 a 4 semanas de desarrollo. Remover el crecimiento bacteriano del medio sólido con un aplicador de madera y disolver directamente en el tubo de reactivo de lisis. Medio de cultivo líquido o Middlebrook 7H9 concentrar el cultivo y desechar el sobrenadante.
- Marcar los tubos de reactivo de lisis con el folio correspondiente a cada prueba

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 83	De: 114

- Pipetear 100 μ l del reactivo de lisis y 100 μ l de buffer de hibridización en los tubos de reactivo de lisis (solo cuando se procesen cepas a partir de medio sólido). Cuando se procesen muestras de medio líquido no adicionar el reactivo de lisis.
- Mezclar con Vortex.

5.2.2.2 Lisis de la Muestra:

- Colocar los tubos de lisis en el Sonicador para mezclar la muestra con los reactivos y se lleve a cabo la reacción.
- Sonicar por 15 min.
- Colocar los tubos en el termo block por 10 min. a 95° +/- 5°C.
- Saque los tubos del termo Block.

5.2.2.3 Hybridización:

- Pipetear 100 μ l de las muestras de los tubos de reactivo de lisis y adicionarlas en los tubos correspondientes al reactivo de sonda.
- Tapé los tubos e incúbelos por 15 min. a 59.5°C – 61°C en un baño de agua.

5.2.2.4 Selección:

- Remueva los tubos del reactivo de sonda del baño. Pipete 300 μ l del reactivo de Selección en cada tubo. Mezcle en Vortex
- Incubar los tubos de reactivo de sonda por 10min. a 59.5°C – 61°C en un baño de agua.
- Saque los tubos del baño y déjelos a temperatura ambiente por 5 min.
- Leer los resultados en el luminómetro metro en una hora máximo.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 84	De: 114

5.2.2.5 Detección:

- Seleccionar el protocolo adecuado para cada cepa en el menú de protocolos del software del equipo.
- Insertar el tubo en el luminómetro metro de acuerdo a las instrucciones del equipo.
- Cuando la lectura del equipo haya terminado sacar el tubo del mismo.

5.2.2.6 Resultados:

- Los resultados de la prueba están basados en los siguientes valores de punto de corte:
 - Positivas: Muestras con igual o mayor valor que el punto de corte.
 - Indeterminadas: Muestras que se encuentran entre ambos valores (+ y -)
 - Negativas: Muestras con menor valor que el punto de corte.

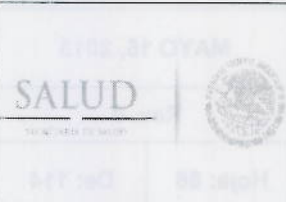

Nota: Los resultados negativos por sonda de DNA se deberán enviar a la sección de PCR para su identificación por la técnica de RFLP y / o secuenciación.

5.2.3 Prueba de sensibilidad manual:

5.2.3.1 Método de las proporciones:

Procedimiento:

- Medio preparado de medio de Middlebrook 7H10 con OADC: Los medios de cultivo sin y con medicamentos se deben preparar al mismo tiempo y su duración es de un mes a partir de la fecha de su preparación, si es que se les mantiene en refrigeración entre 4 y 8° C.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 85	De: 114

- Preparar soluciones stock de los antibióticos con al menos 1,000µg de la droga biológicamente activa por ml de agua desionizada estéril.
- Inmediatamente después de su preparación, dispensar pequeños volúmenes de la solución en viales estériles y congelar a -20°C.

Criterios de resistencia de *M. Tuberculosis* a los medicamentos antituberculosos y potencia.

Medicamento	Concentración µg / ml	Proporción crítica	Potencia µg / mg**
Isoniacida	0.2	1	1000
Isoniacida	1.0	1	1000
Estreptomicina	2.0	1	800
Estreptomicina	10.0	1	800
Rifampicina	1.0	1	1000
Etambutol, clorhidrato	2.0	1	890
Etambutol, clorhidrato	10.0	1	890

(*) Se determina de acuerdo a la información que acompaña al envase

** µg de sustancia activa por mg

- Preparar el agar 7H10 de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Dejar enfriar hasta una temperatura de 50-52°C antes de adicionar el OADC.
- Añadir cada uno de los antibióticos en el medio a la temperatura anteriormente señalada, mezclar bien y dispensar en placas con 2 cuadrantes (10 ml en cada cuadrante).
- El medio debe prepararse solo en cantidades que se utilicen en un mes.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 86	De: 114

- Inoculo: La cepa usada para el estudio debe tener un buen crecimiento (como mínimo 10 colonias) y por lo menos 30 días de desarrollo. Si el número de colonias es menor de 10, la muestra no es representativa de la población bacilar de las lesiones.
- Tomar con un aplicador de madera estéril el mayor número de colonias desarrolladas en el tubo de cultivo de la cepa en estudio.
- Colocarlas en un tubo con perlas de vidrio y tapón de rosca estéril con 5 gotas de agua desionizada estéril.
- Agitar en vortex por 1 min., hasta que se rompa la micobacteria.
- Dejar sedimentar de 30 a 60 segundos.
- Con una pipeta Pasteur retirar la parte homogénea y colocarla en el tubo destinado a preparar la suspensión de Mac Farland, para lo cual se va agregando agua desionizada y agitando, hasta que se ajuste al patrón de Mac Farland No. 1 (108 ufc/ml). Esta es la suspensión madre.
- A partir de esta suspensión se preparan cuatro nuevas suspensiones en escala decimal, utilizando los cuatro tubos con 9 ml de agua destilada estéril rotulados 10-1 a 10-4.
- Las suspensiones decimales se hacen tomando con una micropipeta 1 ml de la suspensión madre y mezclándolo con los 9 ml de agua destilada del primer tubo, es decir el rotulado 10-1. Agitar hasta obtener una suspensión homogénea. A continuación, tomar 1 ml de la suspensión 10-1 y añadirlo a los 9 ml del agua desionizada del tubo 10-2, en la misma forma de antes. Se continúa así sucesivamente hasta preparar las cuatro diluciones.
- Inocular 100 μ l de las diluciones 10-2 y 10-4 sobre grupos idénticos de placas de agar con antibiótico.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 87	De: 114

- Incubar a 35° C en una atmósfera de 5 – 10 % de CO₂ en bolsas de polietileno.
- Examinar las placas semanalmente por 3 semanas.

5.2.3.2 Reporte:

La lectura de la prueba se hace de la siguiente forma: si la prueba se realizó apropiadamente, debe haber de 2+ a 3+ de crecimiento en el control 10-2 y colonias aisladas en el control 10-4.

El conteo se reporta de la siguiente manera:

4+ Crecimiento abundante (500 o más colonias)

3+ 200 – 500 colonias

2+ 100 – 200 colonias

1+ 50 – 100 colonias

Contar < 50 colonias

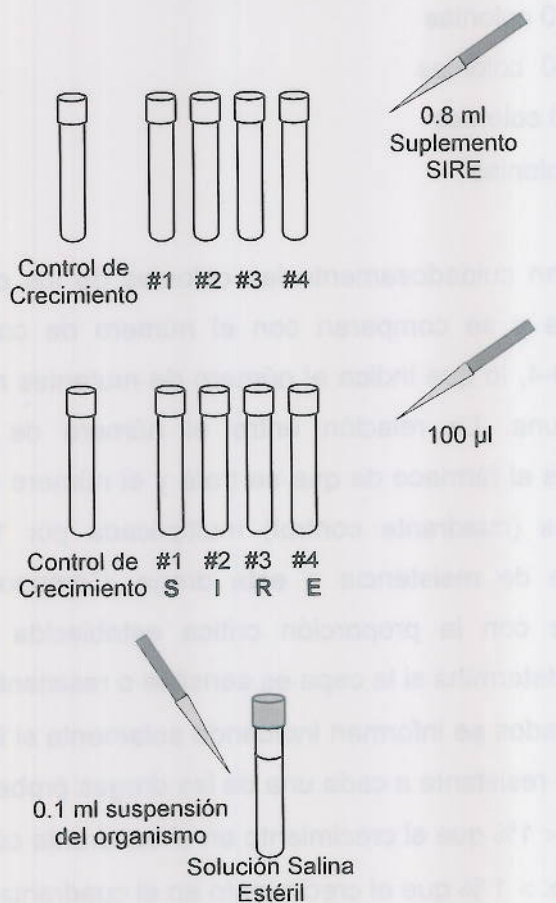
- Se cuentan cuidadosamente las colonias de los cuadrantes con droga y se comparan con el número de colonias del control 10-4, lo que indica el número de mutantes resistentes a cada una. La relación entre el número de mutantes resistentes al fármaco de que se trate y el número de bacilos sembrados (cuadrante control) multiplicada por 100 da el porcentaje de resistencia a esta droga. Comparando este porcentaje con la proporción crítica establecida para esa droga se determina si la cepa es sensible o resistente.
- Los resultados se informan indicando solamente si la cepa es sensible o resistente a cada una de las drogas probadas:
Sensible: < 1% que el crecimiento en el cuadrante control.
Resistente: > 1 % que el crecimiento en el cuadrante control.
- Incluir cepas control ATCC de *Mycobacterium tuberculosis* sensible y resistente cada que se realicen las pruebas de sensibilidad

5.2.4 Pruebas de Susceptibilidad por método automatizado:

- Las pruebas de sensibilidad por el método automatizado BACTEC MGIT se deberán realizar al menos dos veces por semana debido a que se deben proporcionar los resultados de nuestras pruebas de acuerdo a los tiempos de entrega de resultados con el propósito de cumplir con la satisfacción de nuestros clientes.

Procedimiento:

- A) Los tubos de sensibilidad antes de su inoculación se deben preparar de la siguiente manera:



0.8 ml
Suplemento
SIRE

1. Agregar 0.8 ml de Suplemento BACTEC™ MGIT™ 960 SIRE a cada tubo.

100 µl

2. Agregar 100 µl de cada fármaco al tubo MGIT marcado apropiadamente.

0.1 ml suspensión del organismo

Solución Salina Estéril

Control de Crecimiento #1 #2 #3 #4

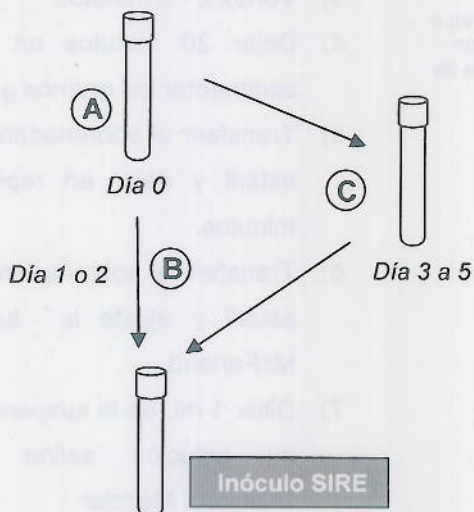
Control de Crecimiento #1 #2 #3 #4
S I R E

3. Preparar el Inoculo de Control de Crecimiento: Pipetear 0.1 ml de inculo de AST en 10 ml de solución salina estéril para preparar una dilución 1:100. Mezclar

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 89	De: 114

B) Prueba de sensibilidad a partir de medio líquido:

De un Tubo MGIT de 7 ml Positivo:



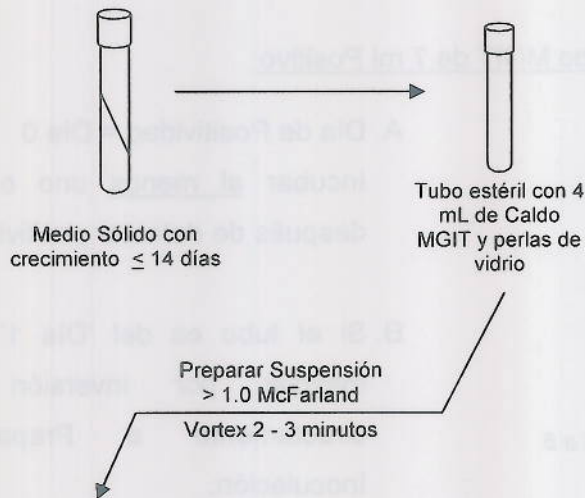
A. Día de Positividad = Día 0

Incubar al menos uno o más días después de detectar positividad

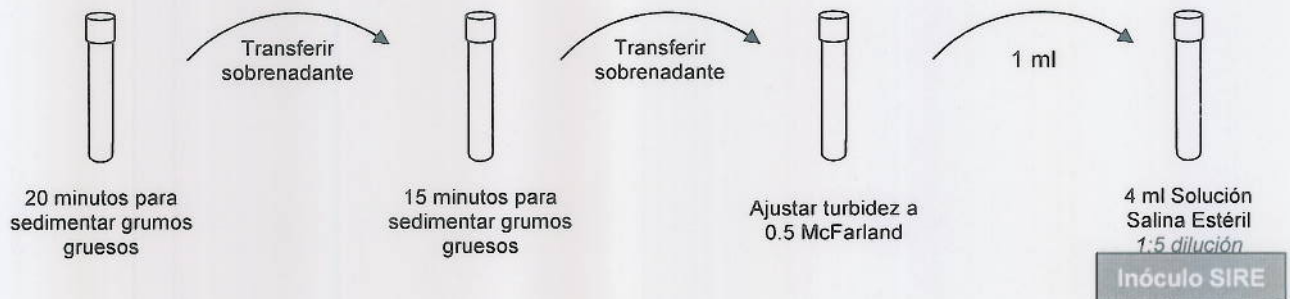
B. Si el tubo es del 'Día 1' o 'Día 2', mezclar por inversión y vaya directamente a Preparación & Inoculación.

C. Si el tubo es del 'Día 3' a 'Día 5', diluir 1 ml del caldo positivo en 4 ml solución salina estéril. Mezclar (1:5 dilución)

C) Prueba de sensibilidad a partir de medio sólido:

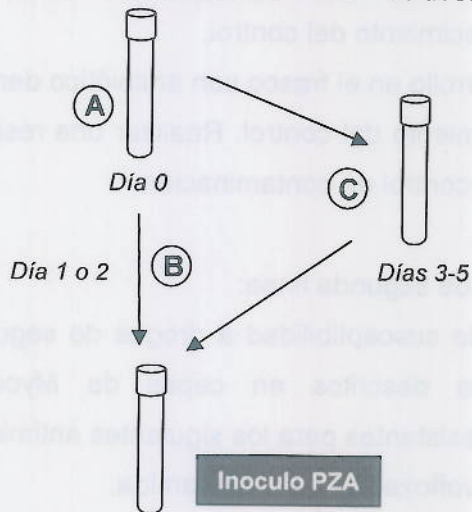


- 1) Usar crecimiento en medio sólido ≤ 14 días.
- 2) Preparar una suspensión >1.0 McFarland en un caldo MGIT que contiene 8 - 10 perlas de vidrio.
- 3) Vortex 2 - 3 minutos.
- 4) Dejar 20 minutos en reposo para sedimentar los grumos grandes.
- 5) Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril y dejar en reposo otros 15 minutos.
- 6) Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril y ajuste la turbidez a 0.5 McFarland.
- 7) Diluir 1 mL de la suspensión final en 4 ml solución salina estéril (1:5 Dilución). Mezclar



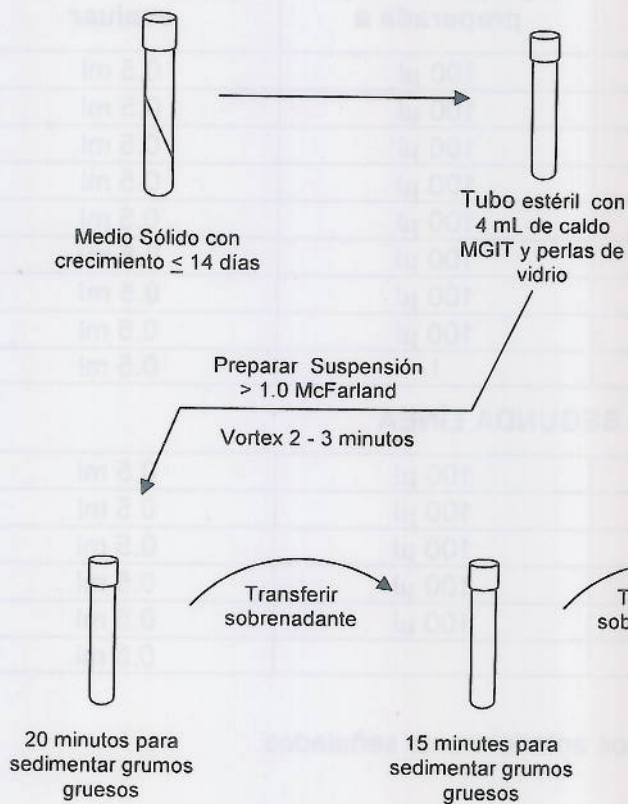
D) Sensibilidad a pirazinamida:
De Medio Líquido:

De un Tubo MGIT de 7 mL Positivo:



- Día de Positividad = Día 0 Incubar al menos uno o más días después detectar positividad.
- Si el tubo es del Día 1 o Día 2, mezclar por inversión y vaya directamente a Preparación & Inoculación.
- Si el tubo es del Día 3 a Día 5, diluir 1 ml del caldo positivo en 4 ml solución salina estéril (1:5 dilución) Mezclar

De Medio Sólido:



- Usar crecimiento de medio sólido ≤ 14 días.
- Preparar una suspensión >1.0 McFarland en caldo MGIT que contiene 8 - 10 perlas de vidrio.
- Vortex 2 - 3 minutos.
- Dejar 20 minutos en reposo para sedimentar los grumos grandes.
- Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril y dejar reposar otros 15 minutos.
- Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril y ajuste la turbidez a 0.5 McFarland.
- Diluir 1 mL de la suspensión final en 4 mL de solución salina estéril para obtener una dilución 1:5. Mezclar.

PZA Inoculo

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 92	De: 114

Interpretación:

- a. **SENSIBLE:** Sin desarrollo en el frasco con antibiótico dentro de los cuatro días de crecimiento del control.
- b. **RESISTENTE:** Desarrollo en el frasco con antibiótico dentro de los cuatro días de crecimiento del control. Realizar una resiembra en gelosa sangre como control de contaminación.

E) Susceptibilidad a drogas de segunda línea:

Se realiza las pruebas de susceptibilidad a drogas de segunda línea por los métodos antes descritos en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multidrogo resistentes para los siguientes antimicrobianos: amikacina, ofloxacina, levofloxacina y proteonamida.

Marcar las botellas con No. de paciente y concentración final	Agregar suplemento de Crecimiento OADC	Agregar la droga preparada a	Agregar el inoculo a evaluar
RIFA 1 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
INH 0.1 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
INH 0.4 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
EMB 5 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
EMB 8µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
STR 1 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
STR 4 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
PZA 100 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
Control de cepa	0.8 ml	I	0.5 ml
DROGAS DE SEGUNDA LÍNEA			
AMK 1 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
OFX 2 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
ETH 5 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
KAN 2.5 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
PAS 4 µg/ml	0.8 ml	100 µl	0.5 ml
Control de cepa	0.8 ml		0.5 ml

Inocular los tubos Mgit de acuerdo a los incisos anteriormente señalados.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 93	De: 114

Preparación de los antibióticos:

Reconstituir con agua destilada o desionizada bajo condiciones asépticas.

Conservación: de 2 a 8°C hasta su fecha de caducidad y ya hidratados se conservan hasta 4 semanas de 2 a 8°C ó hasta 3 meses -20°C, una vez descongelados no se re congela el antibiótico.

- En cada lote de pirazinamida incluir un control de sensibilidad a la prueba con cepas control ATCC de *Mycobacterium tuberculosis* sensible 25618 y resistente 35828.

Incluir tabla de antibióticos

Antibiótico	Concent. del ab reconstituido	Volumen añadido a los tubos mgit para el análisis	Concent. Final en tubo
Estreptomina	83 µg/ml	100 µl	1 µg/ml
Isoniacida	8.3 µg/ml	100 µl	0.1 µg/ml
Rifampicina	83 µg/ml	100 µl	1 µg/ml
Etambutol	415 µg/ml	100 µl	5 µg/ml
Estreptomina	332 µg/ml	100 µl	4 µg/ml
Isoniacida	33.2 µg/ml	100 µl	0.4 µg/ml
Pirazinamida	8000 µg/ml	100 µl	100 µg/ml

Preparación de antibióticos:

- 1) Los antibióticos de alta concentración se reconstituyen con 2 ml de agua desionizada estéril.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013		
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS		Rev. 0		
	ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Hoja: 94	De: 114	

2) La pirazinamida se reconstituye con 2.5 ml de agua desionizada estéril.

Los resultados impresos se entregan a la secretaria adscrita al Servicio de Microbiología Clínica que tiene la función de cotejar con la lista de exámenes solicitados dicho resultado y entregarlo al paciente, archivo o pabellón clínico, (Ver procedimiento PROM 17 y PROM 18) en el formato *Hoja de reporte de resultados* para el expediente clínico.

Si el resultado va al archivo o pabellón, un mensajero de la dirección recibe el resultado de la secretaria del Servicio de Microbiología Clínica para su entrega al destino final, si es paciente externo sin expediente se le entrega directamente al paciente por la secretaria en la fecha que le fue asignada para su recolección.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS		SALUD		
Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Paramédico		Licencia No. 1014054468		
Departamento de Microbiología Clínica		Página 1/1		
Exts. 5256 y 5285				
01/05/2011 08:51:30a.m.				
Nombre del paciente:	[REDACTED]	ID del paciente:	4544-11	
Sexo del paciente:	Masculino	N° de acceso:	454411	
Cama:		Tipo de muestra:	BIOPSIA	
Edad:	40 AÑOS	Servicio de hospital:	CONSULTA EXTERNA	
Zona del cuerpo:	Sin especificar			
Fecha de recogida:	26/05/2011 06:51:33p.m.	Fecha de recibo:	05/2011 06:51:33p.m.	
Antibioterapia:				
Nombre del test	Final	N° anl.	Resultado	Fecha/Hora de resultado
RACHOSCOPIA	<input checked="" type="checkbox"/>		NEGATIVO	01/05/2011 08:51:33a.m.
Cultivo de Micobacterias	<input type="checkbox"/>		CULTIVO NEGATIVO A LOS 60 DIAS	

Firma: _____

REGISTROS

Bitácora de Micobacterias PROM-12 A y reporte de resultados no tienen caducidad.

Cuadro # 1 Pruebas de identificación de micobacterias

PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS

TERMINO DESCRIP TIVO	ESPECIES	VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	TEMP. OPTIMA (°C)	FORMA CION DE PIGMENTO		MORFOLOGIA COLO-NIAL	NIACINA	REDUCCION DE NITRATOS	CATA-LASA SEMI CUAN-TITATIVA (mm de burbujas)	CATA-LASA 68°C	CRECIMIENTO EN T2H	HIDRO-LISIS TWEN	REDUCCION DETELURI-TO	
				OBS.	LUZ									
Complejo TB	<i>M. tuberculosis</i>	Lento	37	-	-	R	0.95	0.97	-45(89)	-	-	±(68)	-	
	<i>M. africanum</i>	Lento	37	-	-	R	-	-	-45	-	V	-	-	
	<i>M. bovis</i>	Lento	37	-	-	Ri	-0.04	-0.09	-45(69)	-	-	-21	-	
	<i>M. bovis BCG</i>	Lento	37	-	-	R	-	-	-45	-	-	-	-	
No Cromógeno	MAC	Lento	37	-07	-	L/R	-	-0.64	-45(98%)	-	-	-	0.33	
	<i>M. xenopi</i>	Lento	42	21	-	L	-	-0.07	-45(85%)	±	-	-0.12	±(65%)	
	<i>M. haemophilum</i>	Lento	30	-	-	R	-	-	-45	-	-	-	-	
	<i>M. mageritense</i>	Lento	37	-88	-	L	-	-	-45(98%)	-	-	-	-	
	<i>M. simouleri</i>	Lento	37	-	-	R	-	-	-45	-	-	-	0.74	
	<i>M. goodii</i>	Lento	37	-	-	L	-	-	-45	-	-	-	-	
	<i>M. celatum</i>	Lento	37	-	-	L/L	-	-	-45	-	-	-	-	
	<i>M. alcinas</i>	Lento	30	-	-	R	-	-	-45	-	-	-	-	
	Comp. <i>M. terrae</i>	Lento	37	-93	-	Ri	-	±(67%)	-45(93%)	-	-	-	-	-
	<i>M. triviale</i>	Lento	37	-	-	R	-	0.27	-45	-	-	-	-0.25	
	<i>M. goodii</i>	Lento	30	-	-	L/L/R	-	-	-45	-	-	-	±(50%)	
	Cromógeno	<i>M. lantana</i>	Lento	37	-	-	L/R/L	-0.04	0.99	-45(93%)	0.91	-	-	-
<i>M. marinum</i>		Lento	30	-	-	L/L/R	-	-	-45	-0.3	-	-	-	
<i>M. smitiae</i>		Lento	37	-	-	L	±(63)	-0.28	-45(93%)	0.95	-	-	-	
<i>M. abscessus</i>		Lento	37	-	-	L	-	-0.05	-45(95%)	0.95	-	-	-	
<i>M. xenopi</i>		Lento	42	-	-	L	-	-	-45	-	-	-	-0.2	
<i>M. goodii</i>		Lento	37	-	-	L	-	-	-45(90%)	0.96	-	-	-0.29	
<i>M. scrofulaceum</i>		Lento	37	-	-	L	-	-0.05	-45(84%)	0.94	-	-	-	
<i>M. szulgai</i>		Lento	37	-	-	L & R	-	-	-45(98%)	0.93	-	-	-	
<i>M. flavescens</i>		Lento	37	-	-	L	-	0.92	-45(94%)	-	-	-	-	
No Cromógeno	<i>M. fortuitum</i>	Rápido	28	-	-	R/L	-	-	-45(93%)	0.9	-	-	0.92	
	<i>M. chelonae</i>	Rápido	28	-01	-	L/R	-	-	-45(92%)	±(53%)	-	-	0.89	
	<i>M. abscessus</i>	Rápido	28	-	-	L/R	-	-	-45	-	-	-	-	
	<i>M. mucogenicum</i>	Rápido	28	-	-	L	-	-	-45	-	-	-	-	
	<i>M. smegmatis</i>	Rápido	28	-	-	L/R	-	-	-45(82%)	-	-	-	-	
Cromógeno	<i>M. phlei</i>	Rápido	28	-	-	R	-	-	-45	-	-	-	-	
	<i>M. vaccae</i>	Rápido	28	-	-	L	-	-	-45	-	-	-	-	

V= variable, t= usual, presente, +/- usual, ausente; R= rugosa, L= lisa, T= transparente, Ri= intermedia en rugosidad, g= azul 14 días positiva.
M. szulgai es escotocromógeno a 37°C y fotocromógeno a 24°C.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 96	De: 114

6. ZONAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO

- 6.1 El laboratorio se mantendrá ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
- 6.2 Las superficies de trabajo se descontaminarán después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.
- 6.3 Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados deberán ser descontaminados antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar.
- 6.4 El embalaje y el transporte de material deberán seguir la reglamentación nacional o internacional aplicable.
- 6.5 Las ventanas que puedan abrirse estarán equipadas con rejillas que impidan el paso de artrópodos.

7. GESTIÓN DE LA BIOSEGURIDAD

- 7.1 Incumbirá al director del laboratorio (la persona que tiene responsabilidad inmediata respecto del laboratorio) garantizar la elaboración y la adopción de un plan de gestión de la bioseguridad y de un manual de seguridad o de operación.
- 7.2 El supervisor del laboratorio (que dependerá del director) velará por que se proporcione capacitación periódica en materia de seguridad en el laboratorio.
- 7.3 Se informará al personal de los riesgos especiales y se le exigirá que lea el manual de seguridad o de trabajo y siga las prácticas y los procedimientos normalizados. El supervisor del laboratorio se asegurará de que todo el personal los comprenda debidamente. En el laboratorio estará disponible una copia del manual de seguridad o de trabajo.
- 7.4 Habrá un programa de lucha contra los artrópodos y los roedores.
- 7.5 Se ofrecerá a todo el personal en caso de necesidad un servicio apropiado de evaluación, vigilancia y tratamiento médico, y se mantendrán los debidos registros médicos.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 97	De: 114

V. DISEÑO E INSTALACIONES DEL LABORATORIO

Al diseñar el laboratorio y asignarle determinados tipos de trabajo, se prestará especial atención a aquellas condiciones que se sepa que plantean problemas de seguridad. Entre ellas figuran:

- La formación de aerosoles.
- El trabajo con grandes cantidades o altas concentraciones de microorganismos.
- El exceso de personal o de material. Por lo que el acceso estará restringido al personal autorizado de laboratorio, y en caso de personal en capacitación temporal (residentes, pasantes, rotantes) con previa autorización de la jefatura de microbiología, enseñanza y la subdirección de servicios auxiliares de diagnóstico y paramédicos.
- La infestación por roedores y artrópodos.
- El mobiliario será robusto y quedará espacio entre mesas y otros muebles, así como debajo de los mismos, a fin de facilitar la limpieza.
- Habrá espacio suficiente para guardar los artículos de uso inmediato, evitando así su acumulación desordenada sobre las mesas de trabajo y en los pasillos. También se dará espacio para el almacenamiento a largo plazo, convenientemente situado fuera de las zonas de trabajo.
- Se preverán espacio e instalaciones para la manipulación y el almacenamiento seguros de disolventes, material radiactivo y gases comprimidos y licuados en caso de ser utilizados.
- Los locales para guardar la ropa de calle y los objetos personales se encontrarán fuera de las zonas de trabajo del laboratorio.
- Los locales para comer y beber y para descansar se dispondrán fuera de las zonas de trabajo del laboratorio.
- En la sala del laboratorio habrá un lavabo con agua corriente, instalado cerca de la salida.
- Las puertas irán provistas de mirillas y estarán debidamente protegidas contra el fuego; se cerrarán automáticamente.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 98	De: 114

- En el nivel de bioseguridad 2 dispone de una autoclave para descontaminación dentro del laboratorio.
- Los sistemas de seguridad comprenden medios de protección contra incendios y emergencias eléctricas, así como duchas para casos de urgencia y medios para el lavado de los ojos.
- Habrá un sistema mecánico de ventilación que introduzca aire del exterior sin recirculación.
- Se contara con un suministro regular de agua de buena calidad.
- Se dispondrá de un suministro de electricidad seguro y de suficiente capacidad, así como de un sistema de iluminación de emergencia que permita salir del laboratorio en condiciones de seguridad. Hay un grupo electrógeno de reserva del instituto para alimentar el equipo esencial (estufas, CSB, congeladores, entre otros).

1. CARACTERÍSTICAS DE DISEÑO DEL LABORATORIO

- 1.1 Se dispondrá de espacio suficiente para realizar el trabajo de laboratorio en condiciones de seguridad y para la limpieza y el mantenimiento.
- 1.2 Las paredes, los techos y los suelos serán lisos, fáciles de limpiar, impermeables a los líquidos y resistentes a los productos químicos y desinfectantes normalmente utilizados en el laboratorio. Los suelos serán antideslizantes.
- 1.3 Las superficies de trabajo serán impermeables y resistentes a desinfectantes, ácidos, álcalis, disolventes orgánicos y calor moderado.
- 1.4 La iluminación será adecuada para todas las actividades. Se evitarán los reflejos y brillos molestos.
- 1.5 El mobiliario debe ser robusto y debe quedar espacio entre mesas, armarios y otros muebles, así como debajo de los mismos, a fin de facilitar la limpieza.
- 1.6 Habrá espacio suficiente para guardar los artículos de uso inmediato, evitando así su acumulación desordenada sobre las mesas de trabajo y en los pasillos. También debe preverse espacio para el almacenamiento a largo plazo, convenientemente situado fuera de las zonas de trabajo.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 99	De: 114

- 1.7 Se preverán espacio e instalaciones para la manipulación y el almacenamiento seguros de disolventes, material radiactivo y gases comprimidos y licuados.
- 1.8 Los locales para guardar la ropa de calle y los objetos personales se encontrarán fuera de las zonas de trabajo del laboratorio.
- 1.9 Los locales para comer y beber y para descansar se dispondrán fuera de las zonas de trabajo del laboratorio.
- 1.10 En cada sala del laboratorio habrá lavabos, a ser posible con agua corriente, instalados de preferencia cerca de la salida.
- 1.11 Las puertas irán provistas de mirillas y estarán debidamente protegidas contra el fuego; de preferencia se cerrarán automáticamente.
- 1.12 En el nivel de bioseguridad 2 se dispondrá de una autoclave u otro medio de descontaminación debidamente próximo al laboratorio.
- 1.13 Los sistemas de seguridad deben comprender medios de protección contra incendios y emergencias eléctricas, así como duchas para casos de urgencia y medios para el lavado de los ojos.
- 1.14 Hay que prever locales o salas de primeros auxilios, convenientemente equipados y fácilmente accesibles (véase el anexo 1).
- 1.15 Cuando se planifique una nueva instalación, habrá que prever un sistema mecánico de ventilación que introduzca aire del exterior sin recirculación. Cuando no se disponga de ventilación mecánica, las ventanas deberán poder abrirse y, a ser posible, estarán provistas de mosquiteras.
- 1.16 Es indispensable contar con un suministro regular de agua de buena calidad. No debe haber ninguna conexión entre las conducciones de agua destinada al laboratorio y las del agua de bebida. El sistema de abastecimiento público de agua estará protegido contra el reflujó por un dispositivo adecuado.
- 1.17 Debe disponerse de un suministro de electricidad seguro y de suficiente capacidad, así como de un sistema de iluminación de emergencia que permita salir del laboratorio en condiciones de seguridad. Conviene contar con un grupo electrógeno de reserva para alimentar el equipo esencial (estufas, CSB, congeladores, entre otros), así como para la ventilación de las jaulas de los animales.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 100	De: 114

- 1.18 Es esencial un suministro fiable y adecuado de gas. La instalación debe ser objeto del debido mantenimiento.
- 1.19 Tanto los laboratorios como los locales destinados a los animales son a veces objeto de actos de vandalismo. Hay que prever sistemas de protección física y contra incendios. Cabe mejorar la seguridad reforzando las puertas, protegiendo las ventanas y limitando el número de llaves en circulación. Se podrán estudiar y aplicar otras medidas, según proceda, para incrementar la seguridad (véase el capítulo 9).

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 101	De: 114

VI. MATERIAL DE LABORATORIO

Junto con los procedimientos y prácticas correctos, el uso de material de seguridad ayudará a reducir los riesgos cuando se trabaje con agentes biológicos que entrañen peligro. En la presente sección se exponen los principios fundamentales relacionados con el material apropiado para los laboratorios de todos los niveles de bioseguridad.

Tras consultar con el funcionario de bioseguridad, el director del laboratorio debe velar por que el material sea apropiado y se utilice debidamente. Para elegir el material de laboratorio habrá que cerciorarse de que responda a los siguientes principios generales:

- Que su diseño permita limitar o evitar los contactos entre el trabajador y el material infeccioso.
- Que esté construido con materiales impermeables a los líquidos, resistentes a la corrosión y acordes con las normas de resistencia estructural.
- Que carezca de rebabas, bordes cortantes y partes móviles sin proteger.
- Que esté diseñado, construido e instalado con miras a simplificar su manejo y conservación, así como a facilitar la limpieza, la descontaminación y las pruebas de certificación; siempre que se pueda, se evitará el material de vidrio y otro material rompible.

Para cerciorarse de que el material posee las características de seguridad requeridas se consultaran sus especificaciones detalladas de funcionamiento y construcción.

1. MATERIAL DE BIOSEGURIDAD INDISPENSABLE

- 1.1 Dispositivos de pipeteo para evitar que se pipetee con la boca. Existen muchos modelos diferentes.
- 1.2 CSB, que se utilizarán en los siguientes casos:

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 102	De: 114

- 1.2.1 Siempre que se manipule material infeccioso; ese material puede ser centrifugado en el laboratorio ordinario si se utilizan vasos de centrifugadora con tapas herméticas de seguridad y si éstos se cargan y descargan en una CSB;
- 1.2.2 Cuando haya un alto riesgo de infección transmitida por vía aérea.
- 1.2.3 Cuando se utilicen procedimientos con grandes posibilidades de producir aerosoles, como la centrifugación, trituración, homogeneización, agitaciones o mezcla vigorosa, desintegración ultrasónica, apertura de envases de materiales infecciosos cuya presión interna pueda diferir de la presión ambiental.
- 1.3 Asas de siembra de plástico desechables. También pueden utilizarse incineradores eléctricos de asas dentro de la CSB para reducir la formación de aerosoles.
- 1.4 Frascos y tubos con tapón de rosca.
- 1.5 Autoclaves u otros medios apropiados para esterilizar el material contaminado.
- 1.6 Pipetas de Pasteur de plástico desechables, cuando estén disponibles, en sustitución del vidrio.
- 1.7 Los aparatos como las autoclaves y las CSB han sido validados con métodos apropiados antes de usarlos. A intervalos periódicos deben ser nuevamente certificados, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2. CARACTERÍSTICAS DE LA CÁMARA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

Certificada en los doce meses anteriores. Su superficie se limpia con un desinfectante apropiado. Rejilla frontal y filtro de salida sin obstrucciones. Uso de llamas desnudas dentro de la cámara. La línea de vacío dispone de filtros y sifones con desinfectante. Se evita la posición incorrecta en relación con las corrientes de aire en la sala. Se utiliza cuando hay posibilidad de que se generen aerosoles.

A continuación se anexa una tabla de materiales de bioseguridad que debe y/o pueden utilizarse en un Laboratorio de Bioseguridad 2:

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 103	De: 114

Equipo de bioseguridad

EQUIPO	PELIGRO EVITADO	CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD
Cámaras de seguridad biológica		
- Clase I	Aerosoles y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Flujo mínimo de aire hacia el interior (velocidad frontal) en la abertura de trabajo. Filtración adecuada del aire expulsado • No protege el producto
- Clase II	Aerosoles y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Flujo mínimo de aire hacia el interior (velocidad frontal) en la abertura de trabajo. Filtración adecuada del aire expulsado • Protege el producto
- Clase III	Aerosoles y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Contención máxima • Protege el producto si se incluye flujo de aire laminar
Cámaras aislantes de material flexible y presión negativa	Aerosoles y salpicaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Contención máxima
Pantalla contra salpicaduras	Salpicadura de sustancias químicas	<ul style="list-style-type: none"> • Establece una separación entre el trabajador y el trabajo
Dispositivos de pipeteo	Riesgos propios del pipeteo por succión bucal, como la ingestión de patógenos, la inhalación de aerosoles producidos por la succión bucal, expulsión de líquido o goteo de la pipeta, contaminación del extremo bucal de la pipeta	<ul style="list-style-type: none"> • Facilidad de empleo • Evita la contaminación del extremo bucal de la pipeta, con lo que protege el dispositivo, el usuario y el circuito de vacío • Posibilidad de esterilización • Se evita el goteo del extremo inferior de la pipeta
Microincineradores de asas, asas desechables	Salpicaduras procedentes de las asas	<ul style="list-style-type: none"> • Protección mediante un tubo de vidrio o cerámica, abierto por un extremo y calentado por gas o electricidad • Desechables, no necesitan calentamiento
Recipientes herméticos para recoger y transportar material infeccioso destinado a la esterilización dentro del laboratorio	Aerosoles, derrames y fugas	<ul style="list-style-type: none"> • Diseño hermético, con tapa • Duraderos • Posibilidad de tratarlos en la autoclave

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 104	De: 114

EQUIPO	PELIGRO EVITADO	CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD
Recipientes para la eliminación de objetos cortantes y punzantes	Heridas punzantes	<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de tratamiento en autoclave • Robustos, a prueba de perforaciones
Recipientes de transporte entre laboratorios e instituciones	Liberación de organismos	<ul style="list-style-type: none"> • Robustos • Recipientes primario y secundario estancos para evitar fugas • Material absorbente para enjugar los escapes
Autoclaves, manuales o automáticas	Material infeccioso (transformado en inocuo para su eliminación o reutilización)	<ul style="list-style-type: none"> • Diseño aprobado • Esterilización térmica eficaz
Frascos con tapón de rosca	Aerosoles y derrames	<ul style="list-style-type: none"> • Contención eficaz
Protección del circuito de vacío	Contaminación del sistema de vacío del laboratorio por aerosoles o rebosamiento de líquidos	<ul style="list-style-type: none"> • Un filtro de tipo cartucho impide el paso de aerosoles (tamaño de las partículas: 0,45 µm) • El matraz de rebosamiento contiene un desinfectante apropiado. Puede usarse una pera de goma para cortar automáticamente el vacío cuando se llena el matraz colector • Todo el sistema puede esterilizarse en la autoclave

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 105	De: 114

Equipo de protección personal

EQUIPO	PELIGRO EVITADO	CARACTERÍSTICAS DE SEGURIDAD
Recipientes para la eliminación de objetos cortantes y punzantes	Heridas punzantes	<ul style="list-style-type: none"> • Posibilidad de tratamiento en autoclave • Robustos, a prueba de perforaciones
Recipientes de transporte entre laboratorios e instituciones	Liberación de organismos	<ul style="list-style-type: none"> • Robustos • Recipientes primario y secundario estancos para evitar fugas • Material absorbente para enjugar los escapes
Autoclaves, manuales o automáticas	Material infeccioso (transformado en inocuo para su eliminación o reutilización)	<ul style="list-style-type: none"> • Diseño aprobado • Esterilización térmica eficaz
Frascos con tapón de rosca	Aerosoles y derrames	<ul style="list-style-type: none"> • Contención eficaz
Protección del circuito de vacío	Contaminación del sistema de vacío del laboratorio por aerosoles o rebosamiento de líquidos	<ul style="list-style-type: none"> • Un filtro de tipo cartucho impide el paso de aerosoles (tamaño de las partículas: 0,45 µm) • El matraz de rebosamiento contiene un desinfectante apropiado. Puede usarse una pera de goma para cortar automáticamente el vacío cuando se llena el matraz colector • Todo el sistema puede esterilizarse en la autoclave

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 106	De: 114

VII. VIGILANCIA MÉDICA Y SANITARIA

La entidad que emplea al personal del laboratorio (Subdirección de servicios auxiliares de diagnóstico y paramédicos) tiene la obligación de cerciorarse, por medio del jefe de servicio de microbiología clínica, de que la salud de dicho personal esté sometida a la debida vigilancia. El objetivo de esa vigilancia es detectar posibles enfermedades contraídas durante el trabajo. Entre las actividades apropiadas para alcanzar ese objetivo figuran las siguientes:

- Proporcionar inmunización activa o pasiva cuando esté indicada.
- Facilitar la detección temprana de infecciones adquiridas en el laboratorio.
- Excluir a las personas muy susceptibles (por ejemplo, embarazadas o personas inmunodeficientes) de las tareas de laboratorio que entrañen mucho riesgo.
- Proporcionar material y procedimientos eficaces de protección personal.

1. NORMAS PARA LA VIGILANCIA DE LOS TRABAJADORES QUE MANIPULAN MICROORGANISMOS EN EL NIVEL DE BIOSEGURIDAD 2

- 1.1 El reconocimiento médico previo al empleo o a la asignación de un puesto es indispensable. Se registrara el historial médico de la persona y realizara una evaluación de la salud ocupacional para los fines del laboratorio.
- 1.2 El jefe del laboratorio de microbiología clínica debe mantener un registro de enfermedades y bajas laborales.
- 1.3 Las mujeres en edad fecunda deberán ser informadas de los riesgos que supone para el feto la exposición profesional a ciertos microorganismos, como el virus de la rubéola. Las medidas concretas que se adopten para proteger al feto dependerán de los microorganismos a los que pueda estar expuesta la mujer.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 107	De: 114

VIII. CAPACITACIÓN

Los errores humanos y las técnicas incorrectas pueden poner en peligro incluso las mejores medidas destinadas a proteger al personal de laboratorio. Por esta razón, el elemento clave para prevenir las infecciones adquiridas, los incidentes y los accidentes en el laboratorio es un personal preocupado por la seguridad y bien informado sobre la manera de reconocer y combatir los peligros que entraña su trabajo en ese entorno.

En consecuencia, la formación continua en el servicio acerca de las medidas de seguridad es primordial. El proceso empieza por el personal directivo, que debe velar por que los procedimientos y prácticas de seguridad en el laboratorio formen parte de la capacitación básica de los empleados.

La formación en medidas de seguridad siempre debe estar integrada en la capacitación inicial de los nuevos empleados. Deben ponerse a disposición del personal el código de prácticas y las directrices locales, incluido el manual de seguridad o de operaciones.

Se adoptarán medidas para garantizar que los empleados hayan leído y comprendido las directrices, como pueden ser las páginas de firmas. Los supervisores del laboratorio deben desempeñar el papel principal en la formación de sus subordinados inmediatos acerca de las técnicas correctas de laboratorio.

El funcionario encargado de la bioseguridad puede colaborar en esa formación y contribuir a la elaboración de materiales y documentos de capacitación.

La capacitación del personal debe comprender siempre la enseñanza de métodos seguros para utilizar procedimientos peligrosos que habitualmente afectan a todo el personal de laboratorio y que entrañan los siguientes riesgos:

- Riesgo de inhalación (es decir, formación de aerosoles): uso de asas, siembra de placas de agar, pipeteo, preparación de frotis, apertura de recipientes de cultivo, toma de muestras de sangre/suero, centrifugación, entre otros.

	<p align="center">MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS</p> <hr/> <p align="center">INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS</p>		<p align="center">MAYO 15, 2013</p> <hr/> <p align="center">Rev. 0</p> <hr/> <table border="1"> <tr> <td data-bbox="1219 210 1370 277">Hoja: 108</td> <td data-bbox="1370 210 1521 277">De: 114</td> </tr> </table>		Hoja: 108	De: 114
Hoja: 108	De: 114					

- Riesgo de ingestión al manipular muestras, frotis y cultivos.
- Riesgo de inoculación cutánea al emplear jeringuillas y agujas.
- Manipulación de sangre y otros materiales patológicos potencialmente peligrosos.
- Descontaminación y eliminación de material infeccioso.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 109	De: 114

IX. MANIPULACIÓN DE DESECHOS

Se considera desecho todo aquello que debe descartarse. En los laboratorios, la descontaminación y la eliminación de desechos son operaciones estrechamente relacionadas. En el trabajo cotidiano, son pocos los materiales contaminados que es preciso retirar del laboratorio o destruir. La mayor parte de la cristalería, los instrumentos y la ropa del laboratorio vuelve a utilizarse o se recicla. El principio básico es que todo el material infeccioso ha de ser descontaminado y esterilizado en autoclave en el laboratorio.

Las principales preguntas que hay que hacerse antes de eliminar cualquier objeto o material de un laboratorio que trabaja con microorganismos o tejidos potencialmente infecciosos son las siguientes:

- ¿Se han descontaminado o desinfectado realmente los objetos o el material por un procedimiento aprobado?
- De lo contrario, ¿se han embalado con un método aprobado para ser incinerados inmediatamente in situ o transferidos a otro laboratorio que tenga capacidad para incinerar?
- ¿Entraña la eliminación de los objetos o materiales descontaminados algún otro peligro, biológico o de otra clase, para quienes realizan las operaciones de eliminación inmediata o para quienes puedan entrar en contacto con los objetos o materiales desechados fuera del recinto del laboratorio?

1. DESCONTAMINACIÓN.

El tratamiento en autoclave de vapor constituye el método de elección para todos los procesos de descontaminación. El material destinado a la descontaminación y eliminación debe introducirse en recipientes (por ejemplo en bolsas de plástico resistentes al tratamiento en autoclave) que tengan un código de color para indicar si el contenido ha de pasar a la autoclave o a la incineración. Sólo se recurrirá a otros métodos si éstos eliminan o destruyen los microorganismos.

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 110	De: 114

Entre las acciones que se tomarán para la descontaminación incluyen:

- Se usará un descontaminante específico para el organismo que se esté usando
- Informe al supervisor del laboratorio de todo derrame y accidente con material infeccioso
- Utilización del descontaminante apropiado para limpiar los derrames
- Descontaminación de las superficies de trabajo antes y después de cada operación, todos los días y tras cualquier derrame

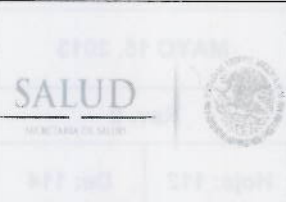

2. PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN Y ELIMINACIÓN DE MATERIAL Y DESECHOS CONTAMINADOS.

Deberá adoptarse un sistema de identificación y separación del material infeccioso y sus recipientes. Se seguirán las normas nacionales e internacionales y se tendrán en cuenta las siguientes categorías:

- Desechos no contaminados (no infecciosos) que puedan reutilizarse o reciclarse o eliminarse como si fueran «basura» en general.
- Objetos cortantes y punzantes contaminados (infecciosos): agujas hipodérmicas, bisturís, cuchillas, vidrio roto; se recogerán siempre en recipientes a prueba de perforación dotados de tapaderas y serán tratados como material infeccioso.
- Material contaminado destinado al tratamiento en autoclave que después pueda lavarse y volverse a utilizar o reciclarse.
- Material contaminado destinado al tratamiento en autoclave y a la eliminación.
- Material contaminado destinado a la incineración directa.

3. OBJETOS PUNZOCORTANTES

Las agujas hipodérmicas no se deben volver a tapar, cortar ni retirar de las jeringuillas desechables después de utilizarlas. El conjunto completo debe colocarse en un recipiente de eliminación específico. Las jeringuillas desechables, utilizadas con o sin aguja, se

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 111	De: 114

introducirán en recipientes de eliminación apropiados y se incinerarán, esterilizándolas previamente en autoclave si fuera necesario.

Los recipientes de eliminación de objetos cortantes y punzantes serán resistentes a la perforación y no se llenarán por completo. Cuando estén llenos en sus tres cuartas partes se colocarán en un recipiente de «desechos infecciosos» y se incinerarán, esterilizándolos primero en autoclave. Los recipientes de eliminación de objetos cortantes y punzantes no se desecharán en vertederos.

4. MATERIAL CONTAMINADO (POTENCIALMENTE INFECCIOSO) PARA SER TRATADO EN AUTOCLAVE O REUTILIZADO

No se efectuará limpieza alguna de ningún material contaminado (potencialmente infeccioso) que vaya a ser tratado en autoclave y reutilizado. Cualquier limpieza o reparación que se revele necesaria se realizará siempre después del paso por la autoclave o la desinfección.

5. MATERIAL CONTAMINADO (POTENCIALMENTE INFECCIOSO) PARA SER ELIMINADO



Aparte de los objetos cortantes y punzantes mencionados más arriba, todo el material contaminado (potencialmente infeccioso) debe ser introducido en recipientes impermeables (por ejemplo en bolsas de plástico que resistan el tratamiento en autoclave marcadas con un código de color) y tratado en autoclave antes de proceder a su Aparte de los objetos cortantes y punzantes mencionados más arriba, todo el material contaminado (potencialmente infeccioso) debe ser introducido en recipientes impermeables (por ejemplo en bolsas de plástico que resistan el tratamiento en autoclave marcadas con un código de color) y tratado en autoclave antes de proceder a su eliminación. Después de pasar por la autoclave, el material puede colocarse en recipientes apropiados para ser transportado al incinerador. Si es posible, el material procedente de actividades relacionadas con la atención sanitaria no debe desecharse en

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 112	De: 114

vertederos, ni siquiera después de haber sido descontaminado. Si se dispone de un incinerador en el laboratorio, no es necesario el tratamiento en autoclave: el material contaminado se coloca en recipientes especialmente marcados (por ejemplo, bolsas con un código de color) y se transporta directamente al incinerador. Los recipientes de transporte reutilizables deben ser impermeables y tener tapas que ajusten debidamente. Se desinfectarán y limpiarán antes de devolverlos al laboratorio para un uso ulterior. En cada puesto de trabajo deben colocarse recipientes, tarros o cubetas para desechos, de preferencia irrompibles (por ejemplo, de plástico). Cuando se utilicen desinfectantes, los materiales de desecho deben permanecer en contacto íntimo con éstos (es decir, sin estar protegidos por burbujas de aire) durante el tiempo apropiado, según el desinfectante que se utilice. Los recipientes para desechos habrán de ser descontaminados y lavados antes de su reutilización.

Para la manipulación de desechos contaminados verificar:

- Los recipientes de desechos infecciosos se utilizan debidamente
- Los recipientes están excesivamente llenos
- Los recipientes están debidamente rotulados y cerrados
- Los cultivos y otros desechos reglamentados se descontaminan correctamente antes de eliminarlos
- Los materiales descontaminados fuera del laboratorio se transportan en recipientes cerrados, duraderos y estancos, conformes con las normas y reglamentaciones locales
- Los desechos mixtos se descontaminan biológicamente antes de ser eliminados como residuos químicos o radiológicos

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 113	De: 114

X. SEGURIDAD QUÍMICA, ELÉCTRICA Y RADIOLÓGICA, PROTECCIÓN CONTRA INCENDIOS Y MATERIAL DE SEGURIDAD.

Los incendios o los accidentes de origen químico, eléctrico o radiológico pueden tener como consecuencia indirecta un fallo de las medidas de contención de organismos patógenos. Así pues, en cualquier laboratorio de microbiología es indispensable mantener un nivel elevado de seguridad en esos aspectos. La promulgación de normas y reglamentos sobre cada una de estas formas de protección incumbe normalmente a las autoridades nacionales y locales competentes, cuya ayuda debe recabarse siempre que sea necesario.



Lic. Mayra Sofía Hernández López
Departamento de Planación

Dr. Raúl Perdomo Salazar
Jefe del Departamento de Planación

Lic. Rosa Estela Utrilla Hernández
Jefe del Departamento de Asesoría Jurídica

Dr. Edgar V. Mesa Aguirre
Director Médico


Dr. Víctor G. Hernández Morales
Subdirector de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Farmacia

	MANUAL DE BIOSEGURIDAD NIVEL 2 LABORATORIOS		MAYO 15, 2013	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS		Rev. 0	
			Hoja: 114	De: 114


XI. AUTORIZACIÓN

REALIZO


Q.F.B. Elia María Flores Pérez
 Coordinadora del Servicio de Microbiología
 Clínica


Dr. José Arturo Martínez Orozco
 Encargado del Servicio de Microbiología
 Clínica

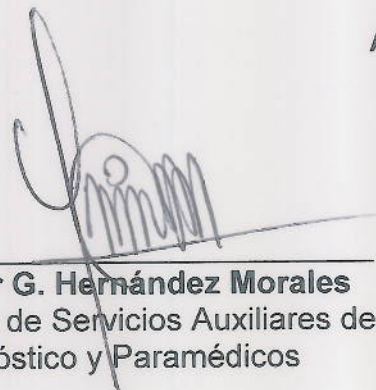
REVISO



DR. Raúl Peñuelas Baldenebro
 Jefe del Departamento de Planeación


Lic. Mayra Sofia Hernández López
 Departamento de Planeación


Lic. Rosa Mayela Uribe Navarrete
 Jefe del Departamento Asuntos Jurídicos

AUTORIZO


Dr. Víctor G. Hernández Morales
 Subdirector de Servicios Auxiliares de
 Diagnóstico y Paramédicos


Dr. Edgar V. Mondragón Armijo
 Director Médico