

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

Validación del preparador automático de muestras de esputo para el diagnóstico de **TBC**

Tesis para optar por el Título de Ingeniero Electrónico, que presenta el bachiller:

Manuel Alfredo Chávez Rodríguez

ASESOR: Ing. Willy Eduardo Carrera Soria
Dr. Benjamín Castañeda Aphan

Lima, diciembre de 2014

INDICE GENERAL

	Pág.
INTRODUCCION.....	1
CAPÍTULO 1: EQUIPOS DE DIAGNOSTICO DE TBC.....	3
1.1 INTRODUCCIÓN.....	3
1.2 XPERT MTB/RIF.....	3
1.2.1 ¿CÓMO FUNCIONA LA PRUEBA?.....	4
1.3 EQUIPO AUTOMATICO DE LECTURA DE PLACAS MODS.....	6
1.4 PAME.....	8
CAPITULO 2: DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO.....	13
2.1 INTRODUCCION	13
2.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EQUIPO.....	13
2.3 ESTRUCTURA MECÁNICA.....	15
2.3.1 ESTRUCTURA PRINCIPAL.....	15
2.3.2 CONTENEDORES DE LOS REACTIVOS.....	17
2.3.3 SOPORTE DEL SERVOMOTOR.....	18
2.3.4 SOPORTE PARA EL PORTAOBJETOS.....	18
2.3.5 OTRAS ESTRUCTURAS.....	19
2.3.5.1 Canalizador de gases.....	19
2.3.5.2 Soporte para el panel de control.....	19
2.3.5.3 Soporte tarjeta de control.....	19
2.3.5.4 Soporte para la fuente de alimentación.....	20
2.4 HARDWARE.....	20
2.4.1 MOTOR.....	20
2.4.2 CALENTADOR CERÁMICO.....	20
2.4.3 ELECTROVÁLVULAS.....	22
2.4.4 SENSORES Y ACONDICIONAMIENTO DE LA SEÑAL.....	23
2.4.4.1 TERMISTOR.....	23
2.4.4.2 SENSOR DE DETECCIÓN DE VAPOR.....	24
2.4.4.3 PULSADORES, INDICADORES Y CONTROL.....	24
2.4.5 FUENTES DE ALIMENTACION.....	27
2.5 SOFTWARE.....	30
2.5.1 PROGRAMA PRINCIPAL.....	30
2.5.2 SUBRUTINAS.....	31

	Pág.
2.5.2.1 Subrutina fucsina.....	31
2.5.2.2 Subrutina alcohol.....	32
2.5.2.3 Subrutina azul de metileno.....	33
2.5.2.4 Subrutina enjuague.....	34
2.5.2.5 Subrutina calentador.....	35
2.5.2.6 Subrutina tiempo de calentamiento.....	36
2.5.2.7 Subrutina finalizado.....	37
2.5.2.8 Subrutina testeo.....	38
CAPITULO 3: ENSAYOS A NIVEL DE EQUIPO.....	39
3.1 INTRODUCCIÓN.....	39
3.2 ENSAYOS Y RESULTADOS.....	39
3.2.1 ENSAYOS DE LA FUENTE DE ALIMENTACION.....	39
3.2.2 ENSAYO DEL CALENTADOR CERÁMICO Y TERMISTOR...	40
3.2.3 PRUEBA DE FILTRADO DE AGUA.....	41
3.2.4 FUNCIONAMIENTO DE LAS ELECTROVÁLVULAS CONECTADAS AL RECIPIENTE.....	42
3.2.5 FUNCIONAMIENTO DE LAS ELECTROVÁLVULAS EN EL EQUIPO.....	42
3.2.6 CALENTAMIENTO DE LA MUESTRA.....	43
3.2.7 FUNCIONAMIENTO COMPLETO DEL EQUIPO.....	44
CAPITULO 4: RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN.....	46
4.1 INTRODUCCION.....	46
4.2 PRIMERA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO.....	47
4.3 VISITA DE LA DOCTORA A LA UNIVERSIDAD.....	47
4.4 SEGUNDA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO.....	48
4.5 TERCERA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO.....	51
4.6 CUARTA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO.....	55
4.7 QUINTA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO.....	62
CONCLUSIONES.....	66
RECOMENDACIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69

RESUMEN

Los principales métodos de diagnóstico del TBC trabajan con muestras de esputo y se basan en la tinción de los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Estos métodos, en la práctica, requieren de un trabajo extenso y agotador de los laboratoristas, quienes a su vez, deben tener gran experiencia. Esto ocasiona que se puedan cometer ciertas imprecisiones, que los métodos se realicen de manera artesanal y que los laboratoristas estén expuestos a posibles contagios.

Es por ello la preocupación por el desarrollo de equipos que realicen el diagnóstico de TBC de manera automática, por lo cual, la sección de electrónica de la Pontificia Universidad Católica del Perú ha desarrollado el Preparador Automático de Muestras de Espudo (PAME) que realiza el diagnóstico de la TBC usando el método de tinción de Ziehl Neelsen.

La presente tesis tiene como objetivo realizar la implementación y validación del equipo, brindando una descripción detallada del funcionamiento de las partes que lo componen y su funcionamiento conjunto, realizando las pruebas correspondientes y explicando el proceso de mejora continua por el cual el equipo es sometido, para realizar el diagnóstico de TBC de una manera conforme a las recomendaciones dadas por el INS y la OMS.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TBC) es la segunda causa mundial de mortalidad, después del SIDA, causada por un agente infeccioso.

El Perú no es la excepción, siendo uno de los países con mayor número de infectados, por lo cual, se busca formas rápidas y eficaces de diagnóstico que permitan detectar la enfermedad en sus primeras etapas.

Uno de los métodos más utilizados, por recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el diagnóstico de la TBC es la tinción de Ziehl Neelsen, la cual se basa en el teñido de los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Sin embargo, el procedimiento es realizado de manera manual por los laboratoristas, lo cual puede ocasionar ciertas imprecisiones, además que están expuestos a un posible contagio.

La sección ha desarrollado un preparador automático de muestras de esputo, el cual realiza el proceso de tinción de las muestras acorde al método de Ziehl Neelsen, para su posterior diagnóstico de la TBC con un microscopio.

El objetivo de la presente tesis es realizar la validación del equipo, verificando su correcto funcionamiento mediante ensayos y luego, en el Hospital Dos de Mayo con un laboratorista, verificar que el equipo cumple con el proceso descrito en el manual del Instituto Nacional de Salud y que los resultados obtenidos de manera automatizada se ajusten o superen los obtenidos de manera manual.

Para ello, la presente tesis se divide en cuatro capítulos. En el primero se dará a conocer otros equipos usados para el diagnóstico de la TBC, realizando una comparación entre los mismos y el equipo realizado en la universidad.

En el segundo capítulo se realizará una descripción completa del equipo, tanto la parte mecánica como la parte electrónica, el porqué de su elección y la función que desempeñan en el proceso de tinción.

En el tercer capítulo se realizará los ensayos correspondientes del equipo, verificando su correcto funcionamiento tanto de sus componentes, como su funcionamiento total, antes de realizar las pruebas en el hospital.

En el cuarto capítulo se realizará la validación del equipo, las pruebas que se realicen en el hospital explicando detalladamente el proceso de mejora por el cual ha ido pasando.



CAPITULO 1

EQUIPOS DE DIAGNÓSTICO DE TBC

1.1 INTRODUCCIÓN

Los métodos más empleados para el diagnóstico de la tuberculosis utilizan la técnica de la baciloscopía y el cultivo por su alta especificidad, sensibilidad y valor predictivo. La baciloscopía consiste en la detección de bacilos en un tipo de muestra mediante un análisis microscópico, para lo cual, la muestra pasa por un proceso de tinción realizado manualmente, haciendo que su diagnóstico sea más sencillo. Dependiendo de si la muestra posee poca carga bacteriana, se somete a un medio de cultivo, en el cual, el bacilo crece lentamente.

Pese a que son métodos tradicionales usados en la mayoría de hospitales, debido a que se realizan de manera manual, los encargados de tratar la muestra se exponen a posibles contagios, además de la posibilidad de cometer imprecisiones en el diagnóstico. Por este motivo, científicos de diversos países han desarrollado equipos que realicen el diagnóstico de la TBC de manera automática, a manera de minimizar los procedimientos manuales y, por lo tanto, la exposición a la bacteria.

En este primer capítulo se hablará de los equipos automatizados, desarrollados en los últimos años por científicos e investigadores, que realizan el diagnóstico de TBC y se hará una comparación entre los mismos, así como también con el equipo desarrollado por la sección.

1.2 XPERT MTB/RIF:

Científicos de diferentes instituciones en Suiza, Alemania, Sudáfrica, Perú, India, Azerbaiyán, y Estados Unidos, han desarrollado un equipo automático que detecta en no más de dos horas si una persona está infectada con el bacilo de la tuberculosis. Además, el método permite detectar si la cepa que afecta al paciente es resistente a la rifampicina, un antibiótico muy usado en el tratamiento de la TBC. (Vicente, 2010)

1.2.1 ¿CÓMO FUNCIONA LA PRUEBA?

El Xpert MTB / RIF detecta secuencias de ADN específicas para *Mycobacterium tuberculosis* y resistencia a la rifampicina por reacción en cadena de la polimerasa. Se basa en el sistema Cepheid GeneXpert, una plataforma rápida y fácil de usar para las pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT). El Xpert® MTB / RIF purifica y concentra los bacilos *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de esputo, aísla material genómico de la bacteria capturados por sonicación, y posteriormente, amplifica el ADN genómico por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El proceso identifica todas las mutaciones de resistencia a la inducción de rifampicina clínicamente relevantes en el gen de la beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* en un formato de tiempo real utilizando sondas fluorescentes llamados balizas moleculares. Los resultados se obtienen a partir de muestras de esputo sin procesar en 90 minutos, con riesgo biológico mínimo y sin necesidad de un entrenamiento especializado para su operación. (WHO, 2014)

El test tiene las siguientes ventajas:

- Prueba molecular completamente automatizada.
- Simultáneamente detecta a *Mycobacterium tuberculosis* y resistencia a rifampicina.
- Provee resultados en menos de dos horas desde la recepción de la muestra, facilitando al personal de salud la prescripción de un esquema adecuado el mismo día.
- Requiere mínima bioseguridad, así como de capacitación al personal de laboratorios.
- El beneficio supera el costo de la prueba: diagnóstico precoz que permita un tratamiento adecuado (corta la cadena de transmisión, disminuya el riesgo de muerte y brinda equidad en el diagnóstico). (OPS, 2014)

En la tabla 1.1 se muestran las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para la utilización del Xpert MTB/Rif.

Tabla 1.1: Recomendaciones de la OMS para la utilización del Xpert MTB/Rif

Recomendaciones de la OPS/OMS para la utilización del Xpert MTB/Rif en el manejo programático de la TB-MDR en las Américas		
Características del paciente	Indicación del Xpert MTB/Rif	Ubicación del equipo Xpert MTB/Rif
TB - MDR: Adulto o niño** con sospecha de TB - MDR. Recomendación fuerte.	Prueba diagnóstica de TB y TB - MDR.	<ul style="list-style-type: none"> Hospitales. Centros de salud con alta demanda de atención.
VIH: Adulto o niño** con VIH y sospecha de TB o TB - MDR. Recomendación fuerte.	1ª prueba diagnóstica de TB y TB - MDR.	<ul style="list-style-type: none"> Centros de salud con alta demanda de atención. Centros de cuidado para personas con VIH y/o poblaciones a alto riesgo de TB.
SR* con: Baciloscopía negativa y/o Rx de tórax con anomalías sospechosas (sin riesgo de TB - MDR ni VIH). Recomendación condicional.	Prueba diagnóstica adicional de TB luego de tamizaje con baciloscopia y/o Radiografía de Tórax.	<ul style="list-style-type: none"> Centros de salud con alta demanda de atención. Centros de atención de pacientes en situaciones específicas (privados de libertad, indígenas).
Sospecha de TB extrapulmonar <u>Meningitis:</u> Recomendación fuerte. <u>Otros:</u> Recomendación condicional. <u>Pleural:</u> No recomendado.	Prueba de diagnóstico inicial en muestras de líquido cefalorraquídeo. Como prueba adicional para el diagnóstico en ganglios linfáticos y otros tejidos.	<ul style="list-style-type: none"> Hospitales. Centros de salud de alta demanda de atención.
*SR: Sintomático Respiratorio: persona con tos de más de 2 semanas. ** Incluye muestras de aspirado gástrico. ‡ Se recomienda que al menos un equipo de Xpert MTB/Rif® sea ubicado en el Laboratorio Nacional de Referencia.		

Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2014

En el 2013 se implementó el Xpert MTB/Rif en diversos países (Ver figura 1.1) (OPS, 2014).



Figura 1.1: Países que utilizan Xpert MTB/Rif en el 2013

Como se puede apreciar el continente que más utiliza el Xpert MTB/Rif es Sudamérica.

1.3 EQUIPO AUTOMÁTICO DE LECTURA DE PLACAS MODS:

Científicos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), con apoyo de la Universidad Nacional de Ingeniería, desarrollaron un sistema que diagnostica tuberculosis multidrogo resistente (TB-MDR) en menos de 15 segundos.

El sistema requiere un microscopio, una computadora, un teléfono celular y una página web, y posibilitará que un paciente con TB-MDR inicie su tratamiento en

menos de una semana y no tras varios meses, como ocurre actualmente mientras se realizan pruebas de susceptibilidad.

El sistema usa la prueba de determinación de Sensibilidad a Fármacos mediante Observación Microscópica (MODS, por sus siglas en inglés), que consiste en examinar con microscopio los caldos de cultivo líquido a partir de una muestra de esputo, para detectar el crecimiento característico del bacilo tras una semana en laboratorio. (Scidev.net, 2010)

El método MODS consiste de un cultivo en medio líquido que permite el crecimiento de colonias de MTB para la posterior detección de patrones morfológicos característicos por medio de un microscopio invertido. MODS nos permite diagnosticar TB además de evaluar susceptibilidad frente a isoniacida y rifampicina directamente de las muestras de esputo en un promedio de 7 días. De esta manera se puede detectar casos no solo de existencia de enfermedad, sino también de multidrogo resistencia tras el análisis de una placa MODS. El método se basa en dos propiedades importantes de MTB: (Mendoza, 2011).

- El crecimiento es más rápido en medio líquido que en medio sólido.
- Su crecimiento característico en forma de cordón es fácilmente reconocible en medio líquido usando un microscopio óptico invertido

Los científicos reemplazaron el microscopio invertido por una versión mucho más barata (unos US\$500) y al personal, por un algoritmo matemático de reconocimiento y diagnóstico automático, ambos integrados a través de un sistema web al que se accede mediante Internet o telefonía celular.

“Cualquier miembro del centro puede poner la placa MODS en el microscopio, fotografiarla digitalmente, subirla a un celular y comunicarse con el servidor, que realiza el análisis. En unos segundos el resultado se transmite por mensaje de texto al celular que solicitó el diagnóstico, a un correo electrónico y a la base de datos de la página web”

La web tiene acceso limitado y será administrada por la UPCH. Al ser un método barato y sencillo puede usarse en cualquier parte del mundo e, incluso, adaptarse para diagnosticar otras enfermedades.

La segunda fase de pruebas se realizará en cuatro lugares del país con alto índice de TB-MDR, lo que requiere una inversión de US\$40 mil, con miras a la creación de un Centro Nacional de Telediagnóstico. (Scidev.net, 2010)

1.4 PREPARADOR AUTOMÁTICO DE MUESTRAS DE ESPUTO (PAME)

El Preparador Automático de Muestras de Esputo es un sistema automático desarrollado por la sección de electrónica de la Pontificia Universidad Católica del Perú, que diagnostica la TBC mediante el método de tinción de Ziehl Neelsen de las muestras de esputo.

El método realizado de manera manual por los laboratoristas, partiendo de la muestra seca en la lámina, consiste de los siguientes pasos (Instituto Nacional de Salud, 1995):

1. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con el colorante fucsina básica fenicada, filtrada en el momento de efectuar la tinción. No use colorante sin filtrar. (Ver figura 1.2)

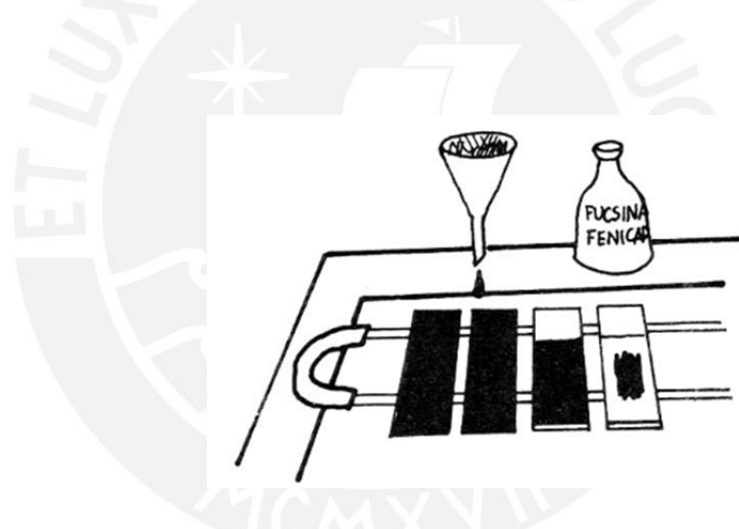


Figura 1.2: Extendidos cubiertos con fucsina básica fenicada

2. Calentar suavemente con la llama del mechero de alcohol o un hisopo de algodón humedecido en alcohol hasta la emisión de vapores, repetir el proceso por tres veces, no debe hervirla preparación. Si el volumen del colorante disminuye por evaporación, debe agregarse más hasta cubrir totalmente el extendido y dejar enfriar.

El tiempo mínimo de coloración con fucsina es de 5 minutos. (Ver figura 1.3)



Figura 1.3: Proceso de calentamiento

3. Eliminar la fucsina tomando la lámina por el extremo numerado, entre el dedo pulgar y el índice o con una pinza, inclinándola hacia adelante y dejando caer agua corriente a baja presión sobre la parte que no tiene el extendido. (Ver figura 1.4)



Figura 1.4: Primer lavado

4. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con la solución de alcohol ácido durante dos minutos, hasta obtener una coloración rosa pálido. De ser necesario decolorar nuevamente, efectuando movimientos en vaivén de la lámina. (Ver figura 1.5)

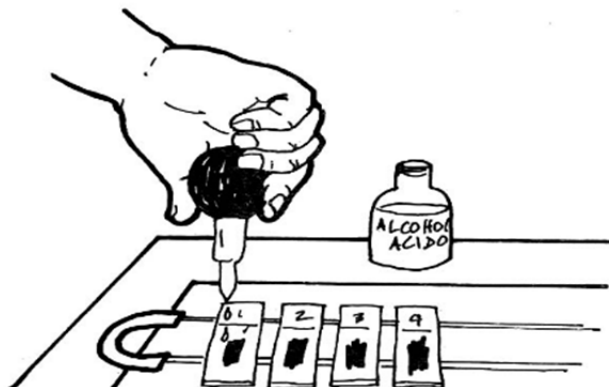


Figura 1.5: Extendidos cubiertos con alcohol ácido

- Una vez eliminado el alcohol ácido lavar nuevamente la lámina con agua a baja presión, cuidando de no desprender la película que formó el extendido. (Ver figura 1.6)

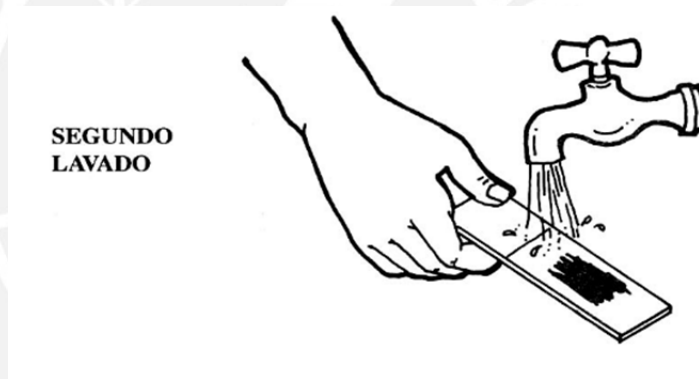


Figura 1.6: Segundo lavado

- Cubrir la superficie del extendido con el colorante azul de metileno, previamente filtrado, durante 30 segundos a un minuto. (Ver figura 1.7)

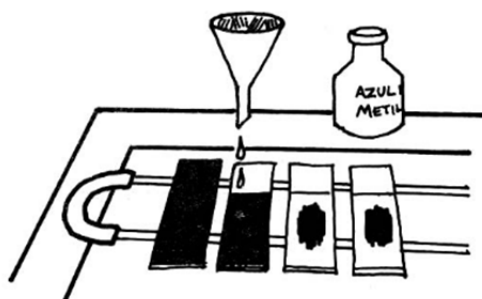


Figura 1.7: Extendidos cubiertos con azul de metileno

7. Eliminar el azul de metileno y lavar cada lámina con agua a baja presión, por ambos lados (el que tiene el extendido, como el otro lado). (Ver figura 1.8)

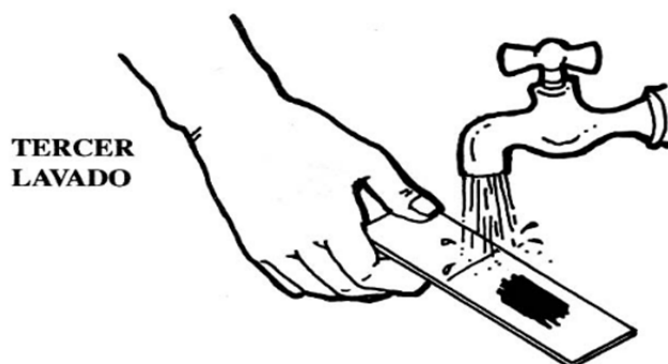


Figura 1.8: Tercer lavado

8. Colocar las láminas coloreadas en orden numérico sobre el soporte de madera y dejar secar al medio ambiente.

Según este método el equipo se ha desarrollado de forma que cumpla con el proceso de tinción, partiendo de la muestra seca como se mencionó, el cual se explica en la figura 1.9.

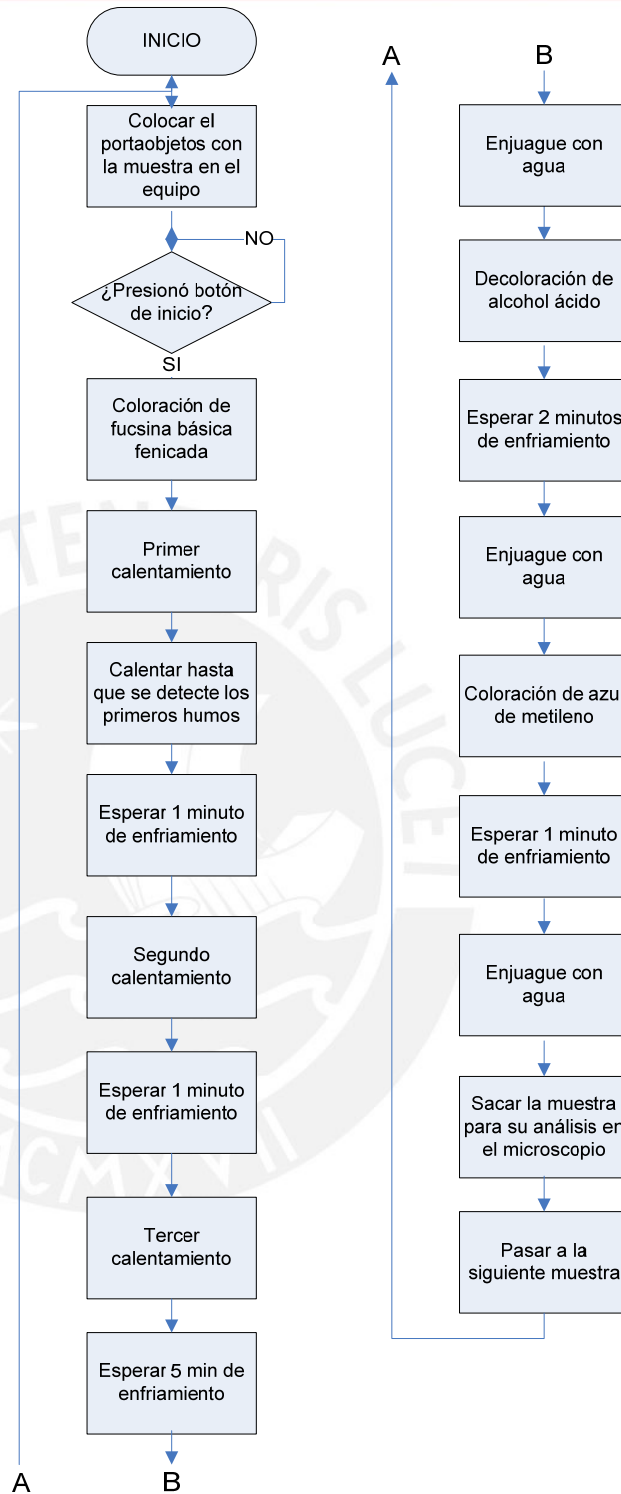


Figura 1.9: Diagrama de flujo del procedimiento realizado por el equipo

En el siguiente capítulo se dará una descripción más detallada de las partes del equipo, el rol que cumple cada una de ellas y el funcionamiento conjunto del equipo.

CAPÍTULO 2

DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO

2.1 INTRODUCCION

Como se mencionó, la sección de electrónica de la PUCP desarrolló un equipo que diagnostica la tuberculosis usando el método de tinción de Ziehl Neelsen.

El lugar de trabajo del equipo es un hospital y para realizar la tinción se hace uso de reactivos, por lo cual, un requerimiento indispensable es fabricar el equipo en un material resistente a la corrosión.

Debido a los considerables gastos en su fabricación, el equipo se construyó inicialmente en una estructura de acrílico, siendo éste un material resistente a la corrosión. Sin embargo, desde un principio se deseaba una estructura de acero inoxidable, debido a que presentaba una mayor resistencia a la corrosión y es de fácil limpieza, siendo otro factor importante al estar en un ambiente de trabajo donde la limpieza de los equipos es parte del protocolo a seguir.

Una vez que se consiguieron los fondos necesarios, se mandó a fabricar la estructura de acero inoxidable, replicando los demás componentes.

Juan Edmundo Pozo, César Lucho y Diego Onchi, encargados del desarrollo del proyecto, me proporcionaron la información necesaria y los componentes del mismo. Con ayuda de Juan Edmundo Pozo se realizó el ensamblado, y posteriormente, se realizaron las pruebas necesarias que corroboraron su funcionamiento.

2.2 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EQUIPO

En el capítulo 1, se describió el Preparador Automático de Muestras de Espudo (PAME), equipo que se basa en el procedimiento de Ziehl Neelsen para realizar la tinción de muestras de esputo. Como se explicó, en el proceso de tinción se aplican cantidades específicas de reactivo a la muestra de manera secuencial, respetando los intervalos de tiempo definidos por el proceso. Además, también se describe una etapa de calentamiento que facilitará la penetración del reactivo a la muestra. También es importante considerar que el ambiente de trabajo es un hospital, por lo cual el equipo deberá ser resistente a la corrosión provocada por

los químicos. En base a estos requerimientos el equipo automático se diseñó de la siguiente manera:

- Estructura de acero inoxidable que soportará el sistema.
- Tres recipientes de acrílico para contener los tres reactivos correspondientes: fucsina básica fenicada, alcohol ácido y azul de metileno.
- Una entrada para el ingreso de agua mediante una manguera.
- Una fuente de alimentación de 24 V que suministrará voltaje para el funcionamiento del equipo.
- Cuatro electroválvulas que regularán el reactivo que cae sobre la muestra.
- Un soporte para colocar el portaobjetos.
- Un servomotor que le dará una inclinación a la muestra, facilitando su limpieza cuando se vierta el agua.
- Un calentador cerámico que calentará la muestra de esputo después de verter fucsina sobre la misma.
- Un panel de control que nos permitirá controlar mediante pulsadores e indicar mediante leds el proceso que se ejecuta.
- Un embudo para canalizar los gases.
- Un microcontrolador que controlará la apertura y cierre de las electroválvulas, el tiempo de calentamiento del calentador cerámico, el movimiento del servomotor y los leds indicadores del panel de control.

En la figura 2.1 se muestra un esquema general del sistema automático.

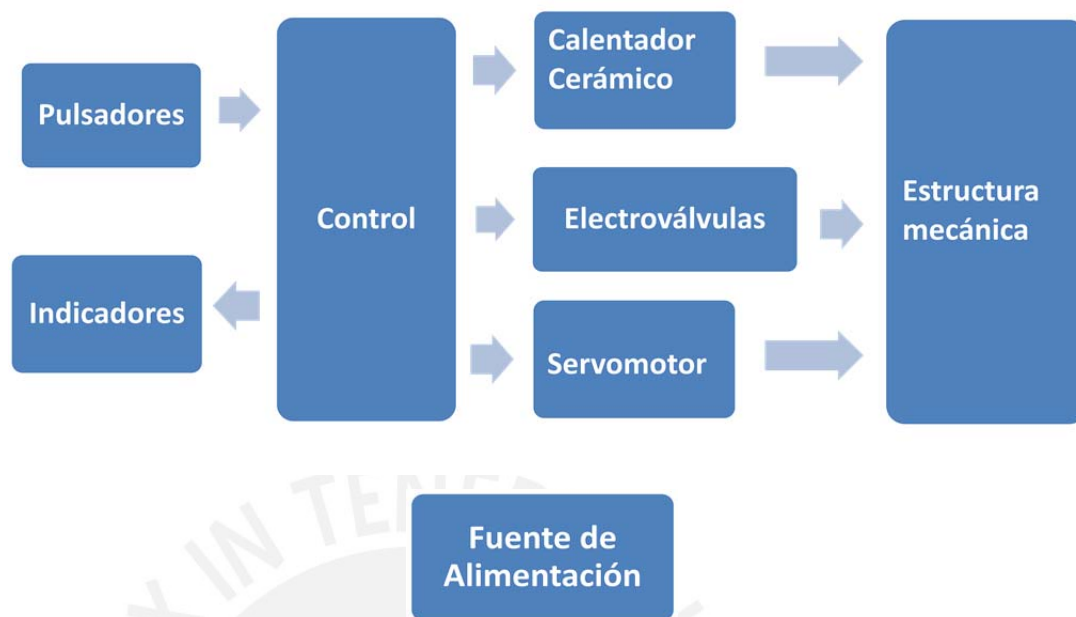


Figura 2.1: Diagrama general del sistema automático

2.3 ESTRUCTURA MECÁNICA

2.3.1 ESTRUCTURA PRINCIPAL

El nuevo equipo tiene una estructura de acero inoxidable la cual fue construida tomando como modelo la estructura inicial de acrílico. Sus dimensiones son:

- Altura: 46 cm
- Largo: 36 cm
- Ancho: 25 cm

La estructura principal consta de dos partes: una delantera y una posterior. (Ver figuras 2.2, 2.3 y 2.4)

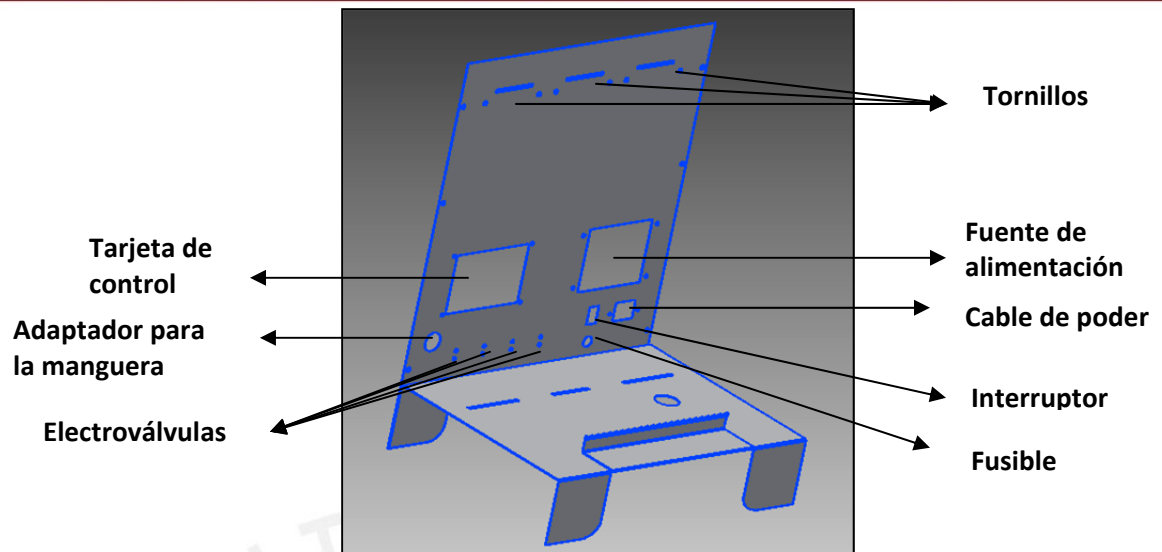


Figura 2.2: Parte posterior

En la parte posterior se colocarán:

- En la parte superior se colocarán los tornillos para los contenedores de los reactivos.
- La fuente de alimentación, con su respectivo interruptor, fusible y cable de poder, y la tarjeta de control.
- Las electroválvulas que estarán sujetas con unas abrazaderas.
- El adaptador para la manguera por el cual ingresará el agua. (Ver figura 2.2)

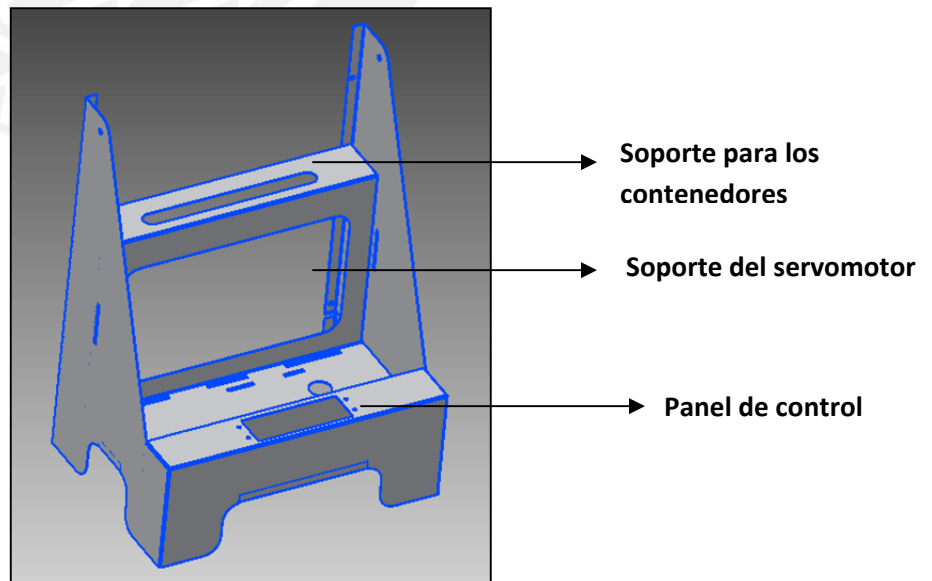


Figura 2.3: Parte delantera

En la parte delantera se colocarán:

- El panel de control.
- El soporte del servomotor.
- Esta estructura servirá de soporte para los contenedores. (Ver figura 2.3)

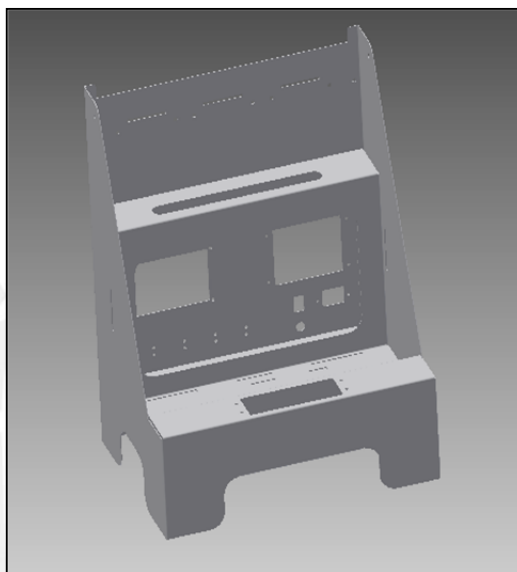


Figura 2.4: Parte posterior y parte delantera ensambladas

2.3.2 CONTENEDORES DE LOS REACTIVOS

El equipo posee tres recipientes hechos de acrílico sellados con silicona líquida, anclados a la estructura de acero inoxidable, hechos para contener los tres reactivos utilizados en el proceso de tinción de Zielh Neelsen. (Ver figura 2.5)

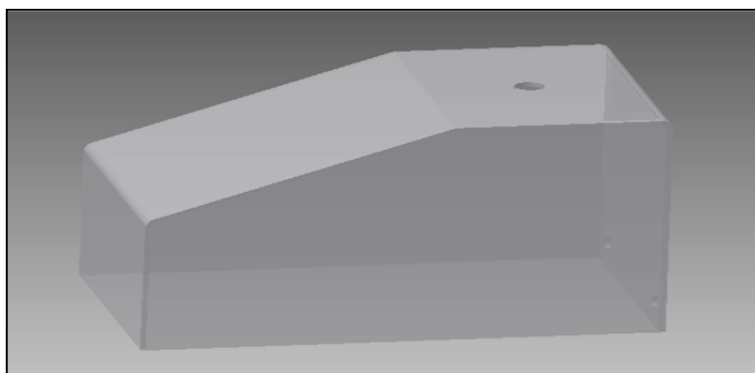


Figura 2.5: Recipiente de acrílico

La elección del acrílico se debe a que es un material económico y además es resistente a la corrosión, lo cual cubre los requerimientos planteados.

2.3.3 SOPORTE DEL SERVOMOTOR

En esta estructura se colocará el servomotor que va fijado al soporte del portaobjetos y el canalizador de gases.

Este soporte también sirve para cubrir los circuitos electrónicos del equipo y tiene la ventaja de ser removible, se puede sacar fácilmente, lo cual permite la revisión rápida de la parte electrónica en caso sea necesario. (Ver figura 2.6)

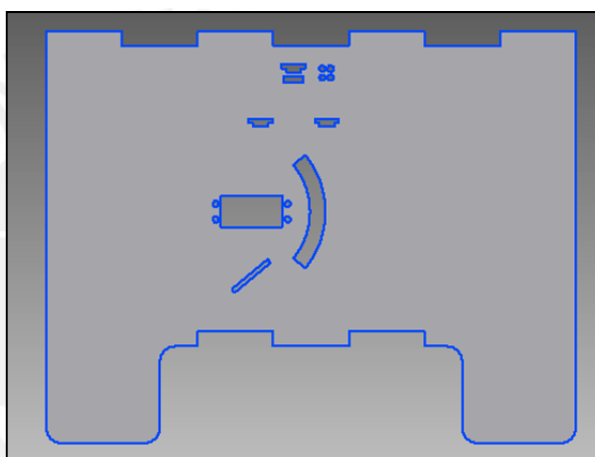


Figura 2.6: Soporte del servomotor

2.3.4 SOPORTE PARA EL PORTAOBJETOS

Soporte en el que se colocará la muestra a ser tratada. A su vez dispone de un espacio para colocar el calentador y una placa de metal, que irán por debajo de la muestra para calentarla de manera uniforme. (Ver figura 2.7)

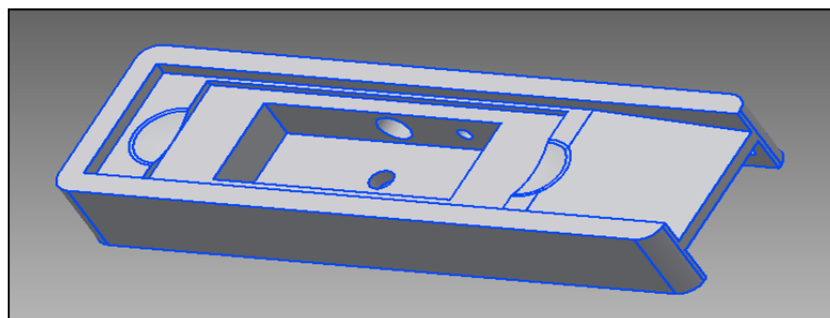


Figura 2.7: Soporte para el portaobjetos

2.3.5 OTRAS ESTRUCTURAS

2.3.5.1 Canalizador de gases (Ver figura 2.8)

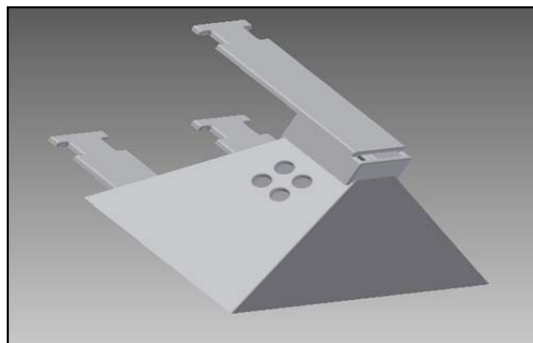


Figura 2.8: Canalizador de gases

2.3.5.2 Soporte para el panel de control

Se colocan los pulsadores e indicadores, los cuales nos sirven para monitorear el procedimiento. (Ver figura 2.9)

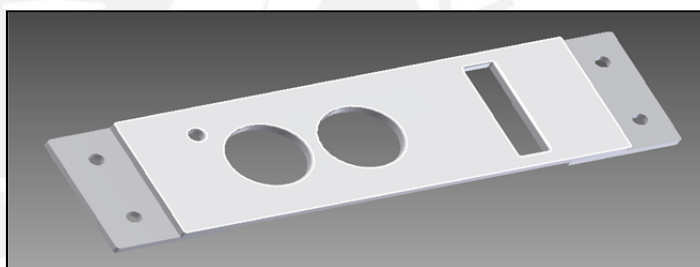


Figura 2.9: Soporte para el panel de control

2.3.5.3 Soporte de la tarjeta de control (Ver figura 2.10)

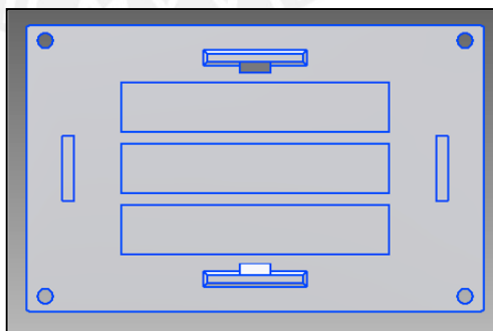


Figura 2.10: Soporte de la tarjeta de control

2.3.5.4 Soporte para la fuente de alimentación (Ver figura 2.11)

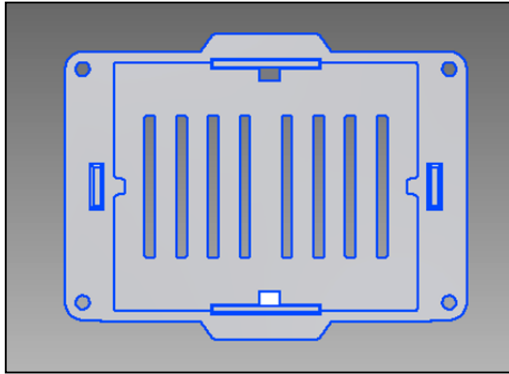


Figura 2.11: Soporte para la fuente de alimentación

2.4 HARDWARE

2.4.1 MOTOR

Se utilizó un servomotor para darle una inclinación precisa al soporte del portaobjetos, lo cual nos servirá al momento del enjuague para que caigan los desperdicios. (Ver figuras 2.12 y 2.13)



Figura 2.12: Servomotor

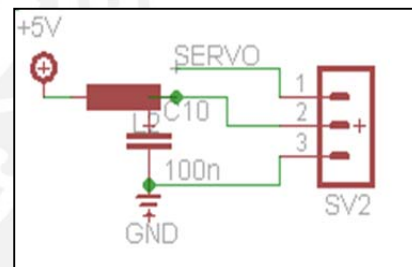


Figura 2.13: Circuito esquemático del Servomotor

2.4.2 CALENTADOR CERÁMICO

Como se mencionó, el calentador cerámico se utilizará para calentar la muestra de esputo después de verter fucsina sobre la misma. Empieza a calentar cuando recibe un voltaje de 24 V y deja de calentar a 0 V. El tiempo de calentamiento se controlará con el microcontrolador, tomando en cuenta que el calentador cerámico calienta lentamente y se demora en enfriar.

Especificaciones del calentador cerámico:

- Material: Acero inoxidable
- Núcleo: Cerámico
- Diámetro: 6 mm
- Longitud del núcleo: 20 mm
- Dos cables para la alimentación
- Longitud del cable: 100 cm
- Voltaje de funcionamiento: 24 V
- Resistencia: 12-14.8 ohmios
- Potencia: 40 W

En la figura 2.14 se muestra una imagen del calentador cerámico y en la figura 2.15 se muestra la conexión del calentador con el microcontrolador, donde se puede apreciar:

- En X4-1 (24 V) y X4-2 (0V) se conectará el calentador.
- Un diodo de protección para que el microcontrolador no se exponga a ninguna corriente de entrada.
- El pin HEATER se conectará al microcontrolador para regular el encendido y apagado del calentador, mediante un mosfet selector.



Figura 2.14: Calentador Cerámico

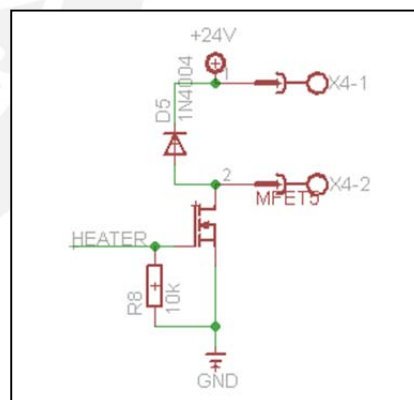


Figura 2.15: Circuito esquemático

2.4.3 ELECTROVÁLVULAS

Las electroválvulas controlan el flujo de los reactivos de una manera precisa. Se abren cuando se alimentan con 12 V y se cierran cuando se dejan de energizar. El tiempo de goteo se controlará con el microcontrolador.

Especificaciones de las electroválvulas:

- Longitud de la manguera: 30 cm
- Diámetro de la manguera:
- Diámetro interno: 1/16 “
- Diámetro externo: 1/8 “
- Presión máxima: 15 psi (1 bar)
- Voltaje de funcionamiento: 12 V
- Potencia: 2.6 W

En la figura 2.16 se muestra una imagen de la electroválvula y en la figura 2.17 se muestran las conexiones con el microcontrolador, donde se puede apreciar:

- En X2-2 (12V), X2-1 (0V) se conectará la válvula 1 encargada de regular el flujo de agua; en X2-4 (12V), X2-3 (0V) la válvula 2 encargada de regular el flujo de fucsina; en X2-6 (12V), X2-5 (0V) la válvula 3 encargada de regular el flujo de alcohol ácido; en X2-8 (12V), X2-7 (0V) la válvula 4 encargada de regular el flujo de azul de metileno.
- Un diodo de protección para que el microcontrolador no se exponga a ninguna corriente de entrada.
- Los pines VALV1, VALV2, VALV3 y VALV4 se conectarán al microcontrolador para regular la apertura y el cierre de las electroválvulas, mediante un mosfet selector.



Figura 2.16: Electroválvula Cole Parmer

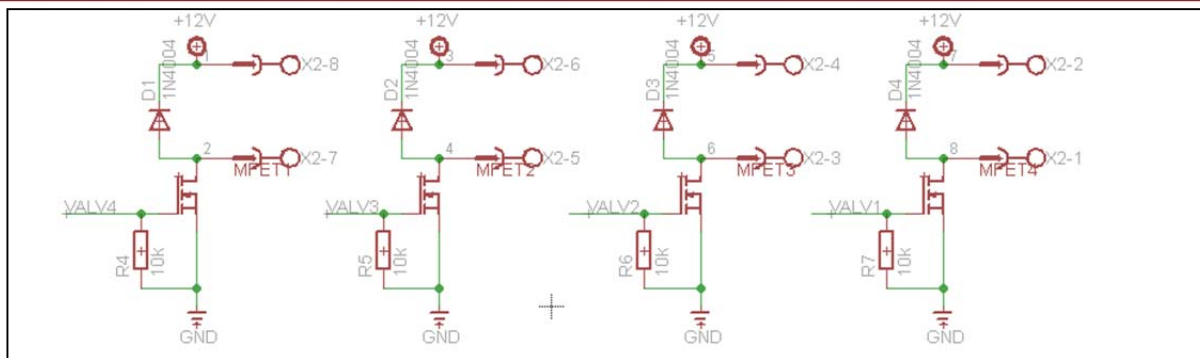


Figura 2.17: Circuito esquemático para las válvulas

2.4.4 SENSORES Y ACONDICIONAMIENTO DE LA SEÑAL

2.4.4.1 TERMISTOR

El termistor o sensor de temperatura, varía su resistencia conforme va variando la temperatura. Debido a su amplio rango de medición se utilizará para realizar las mediciones de temperatura en la etapa de calentamiento.

Especificaciones:

- Encapsulado de vidrio, termo resistivo y altamente estable.
- Soporta hasta una temperatura máxima de 300°C.

Se utilizará el termistor EPCOS 100k que se muestra en la figura 2.18. En la figura 2.19 se muestra el circuito esquemático del termistor, siendo X5-2 y X5-1 donde se conectará el termistor y TEMP conectado al microcontrolador.



Figura 2.18: Termistor EPCOS 100 k

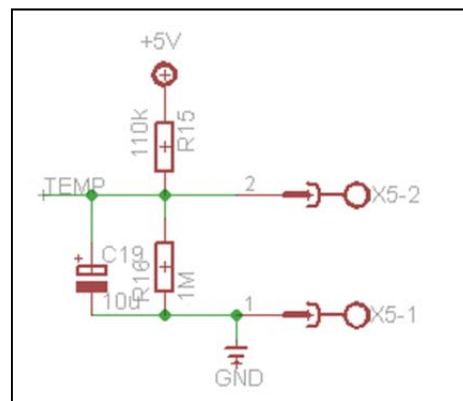


Figura 2.19: Circuito esquemático

2.4.4.2 SENSOR DE DETECCIÓN DE VAPOR

El sensor de humedad se utilizará para la detección de gases procedente de la muestra durante la etapa de calentamiento. (Ver figuras 2.20 y 2.21)

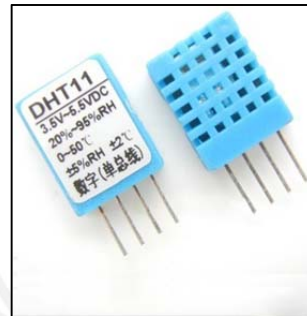


Figura 2.20: Sensor de humedad DHT11

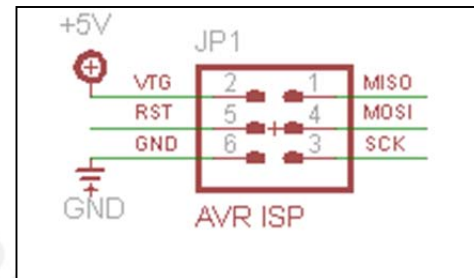


Figura 2.21: Circuito esquemático

2.4.4.3 PULSADORES, INDICADORES Y CONTROL

Los pulsadores sirven para controlar el proceso y los leds nos indican que procesos se están ejecutando en ese momento. (Ver figuras 2.22, 2.23, 2.24, 2.25, 2.26)



Figura 2.22: Pulsadores e Indicadores

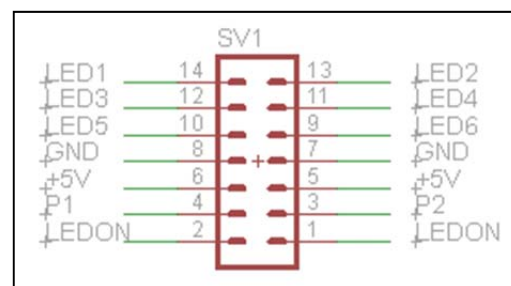


Figura 2.23: Circuito esquemático de los pulsadores e indicadores

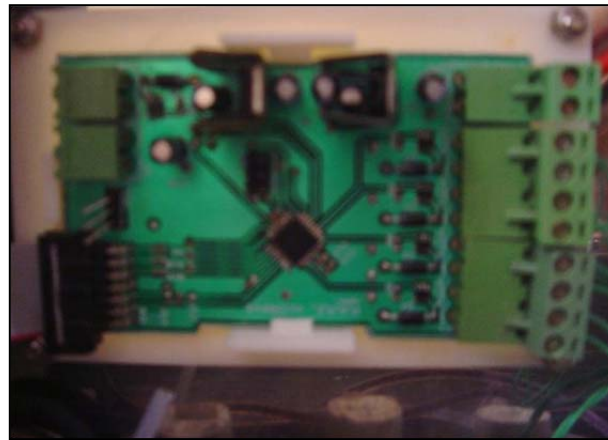


Figura 2.24: Tarjeta de Control

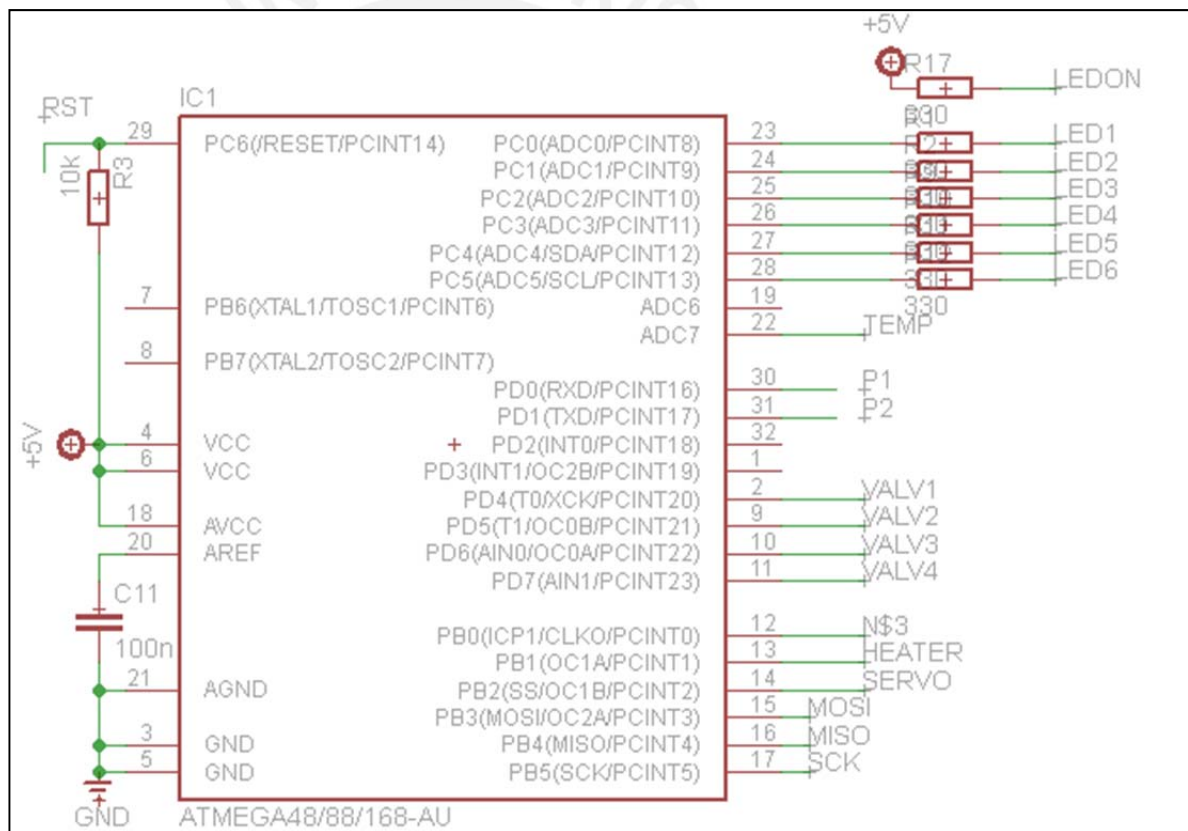


Figura 2.25: Circuito Esquemático de la Tarjeta de Control

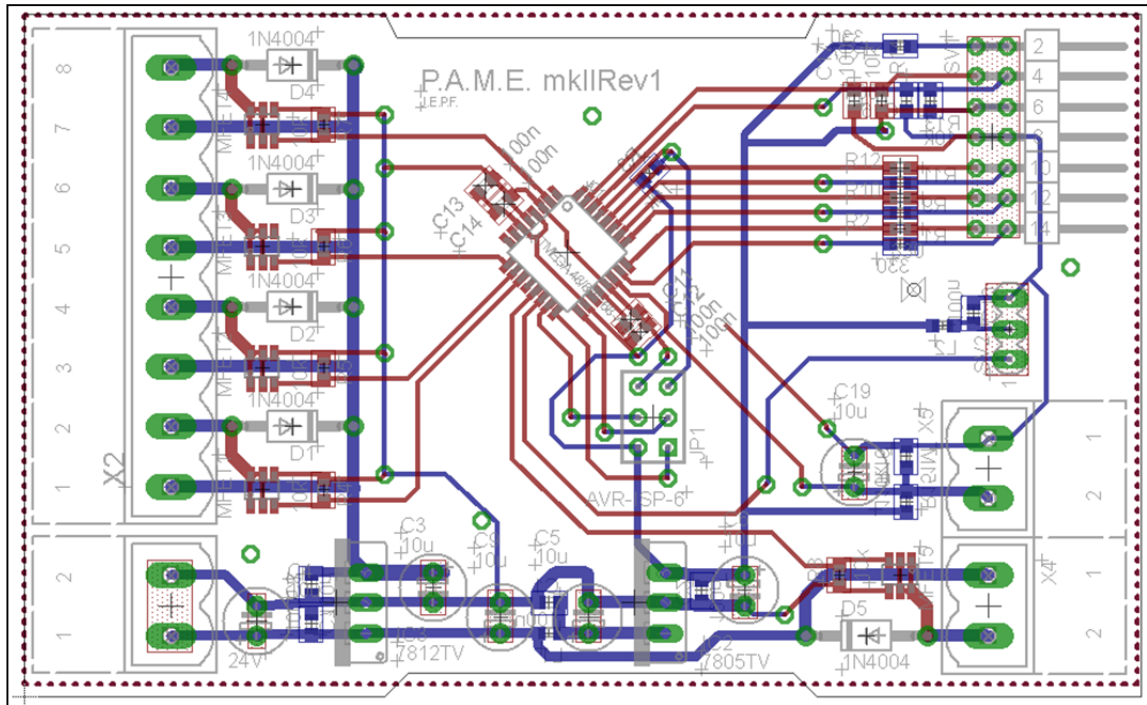


Figura 2.26 Circuito Impreso de la Tarjeta de Control

2.4.5 FUENTE DE ALIMENTACIÓN

La fuente de alimentación nos proporciona el voltaje para que funcione nuestro sistema. (Ver figura 2.27).

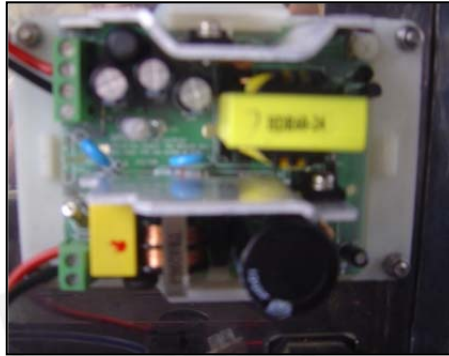


Figura 2.27: Fuente de alimentación de 24 V

Además se tienen reguladores, lo cual nos ayuda a energizar aquellos componentes que necesiten un menor nivel de voltaje. (Ver figuras 2.28 y 2.29)

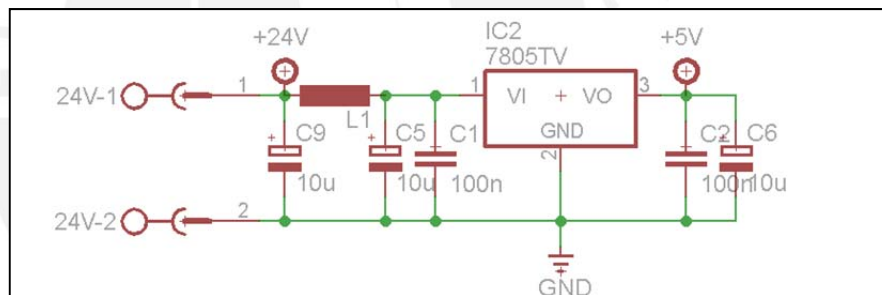


Figura 2.28: Circuito Esquemático del Regulador de 5 V

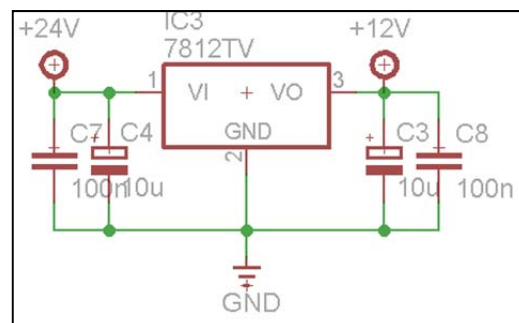


Figura 2.29: Circuito Esquemático del Regulador de 12 V

Debido al calentamiento de los reguladores se necesitan disipadores que evacuen el calor generado.

Para seleccionar los disipadores se necesita saber su resistencia térmica, para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$Q = \frac{Top. max. - Tamb. max.}{\theta_{jc} + \theta_{cd} + \theta_{heat sink}}$$

Donde:

Q= Potencia de disipación

Top.max.= Temperatura de operación máxima

Tamb.max. = Temperatura de ambiente máxima

θ_{jc} = Resistencia térmica entre la unión y la cápsula del componente

θ_{cd} = Resistencia térmica entre la cápsula y el disipador

$\theta_{heat sink}$ = Resistencia térmica del disipador

Para el regulador 7805:

$$Q = (V_{in} - V_{out}) \times I$$

Donde:

V_{in} = Voltaje de entrada

V_{out} = Voltaje de salida

I = Corriente de salida

Se sabe que:

$$V_{in} = 24 \text{ V} \quad V_{out} = 5 \text{ V} \quad I = 0.2 \text{ A}$$

Entonces:

$$Q = (24 - 5) \times 0.2$$

$$Q = 3.8 \text{ Watts}$$

Además, de la hoja de datos del regulador, el uso de silicona entre la cápsula y el disipador, y las máximas condiciones del ambiente de trabajo se sabe que:

$$Top.max.=150 \text{ }^\circ\text{C}, T_{amb.max.}=35^\circ\text{C}, \theta_{jc} = 3^\circ\text{C/W}, \theta_{cd} = 0.5^\circ\text{C/W}$$

Entonces:

$$3.8 = \frac{150 - 35}{3 + 0.5 + \theta_{heat\ sink}}$$

$$\theta_{heat\ sink} = 26.76 \text{ } ^\circ\text{C/W}$$

Para el regulador 7812:

Se sabe que:

$$V_{in} = 24 \text{ V} \quad V_{out} = 12 \text{ V} \quad I = 0.3 \text{ A}$$

Entonces:

$$Q = (24 - 12) \times 0.3$$

$$Q = 3.6 \text{ Watts}$$

Además de la hoja de datos del regulador y las máximas condiciones del ambiente de trabajo se sabe que:

$$T_{top,max.} = 150 \text{ } ^\circ\text{C}, \quad T_{amb,max.} = 35 \text{ } ^\circ\text{C}, \quad \theta_{jc} = 3 \text{ } ^\circ\text{C/W}, \quad \theta_{cd} = 0.5 \text{ } ^\circ\text{C/W}$$

Entonces:

$$3.6 = \frac{150 - 35}{3 + 0.5 + \theta_{heat\ sink}}$$

$$\theta_{heat\ sink} = 28.44 \text{ } ^\circ\text{C/W}$$

Por lo tanto en ambos casos se decidió escoger un disipador de $25 \text{ } ^\circ\text{C/W}$ que es el valor más próximo y comercial (**Ver figura 2.30**).



Figura 2.30: Disipador de aluminio anodizado de 19x12.7x12.7 mm

2.5 SOFTWARE

2.5.1 PROGRAMA PRINCIPAL

- Se configuran los puertos de entrada, salida, el temporizador y el ADC.
- Espera a que se presione el pulsador P1 o el pulsador P2.
- Si se presiona el pulsador P1 ejecuta el procedimiento de tinción Ziehl Neelsen definido por las subrutinas: fucsina, alcohol, azul de metileno y finalizado.
- Si se presiona el pulsador P2 se ejecuta la subrutina calibración.

(Ver figura 2.31)

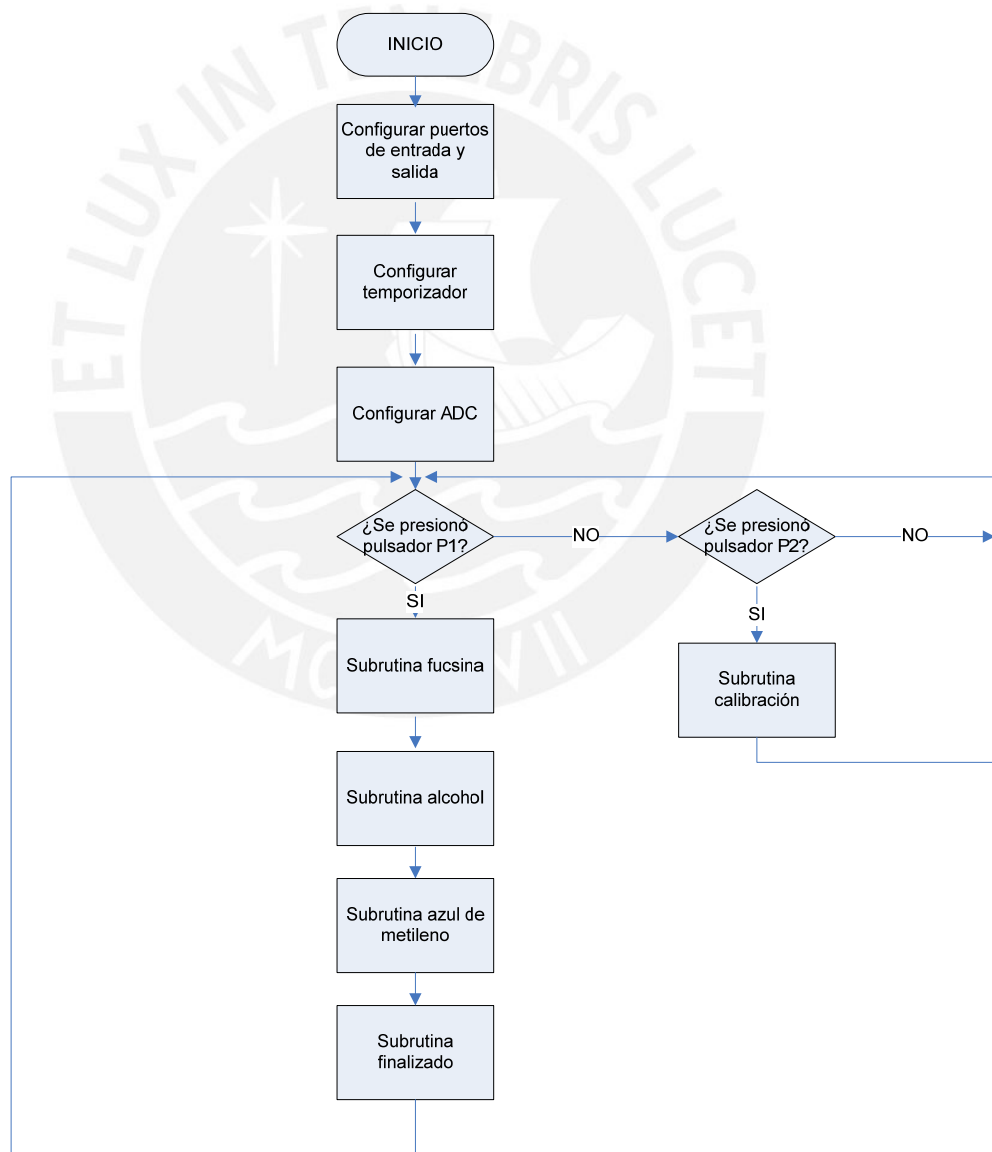


Figura 2.31: Diagrama de flujo del programa principal

2.5.2 SUBROUTINAS

2.5.2.1 Subrutina fucsina

- Prende solamente el led que indica el procedimiento de fucsina.
- Se abre la válvula y empieza el goteo del reactivo.
- El portaobjetos realiza el movimiento de posición_inicial-inclinación-posición_inicial mientras realiza el goteo del reactivo.
- Se cierra la válvula y empieza a calentar.
- Termina de calentar y se enjuaga la muestra.

(Ver figura 2.32)

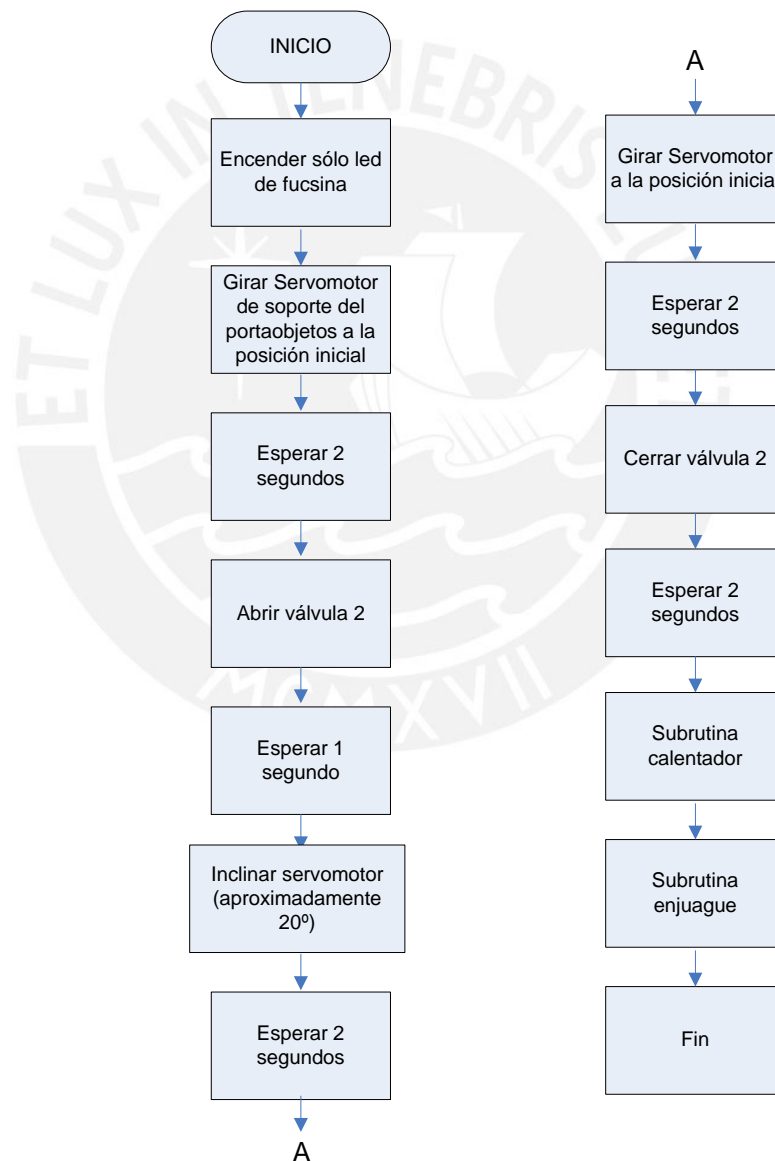


Figura 2.32: Diagrama de flujo de la subrutina fucsina

2.5.2.2 Subrutina alcohol

- Prende solamente el led que indica el procedimiento de alcohol ácido.
- Se abre la válvula y empieza el goteo del reactivo.
- El portaobjetos realiza el movimiento de posición_inicial-inclinación-posición_inicial mientras realiza el goteo del reactivo.
- Se cierra la válvula.
- Cada 0.1 segundos se lee la entrada del pulsador P2 para ver si el proceso se repite.
- Se enfría dos minutos y se enjuaga la muestra.

(Ver figura 2.33)

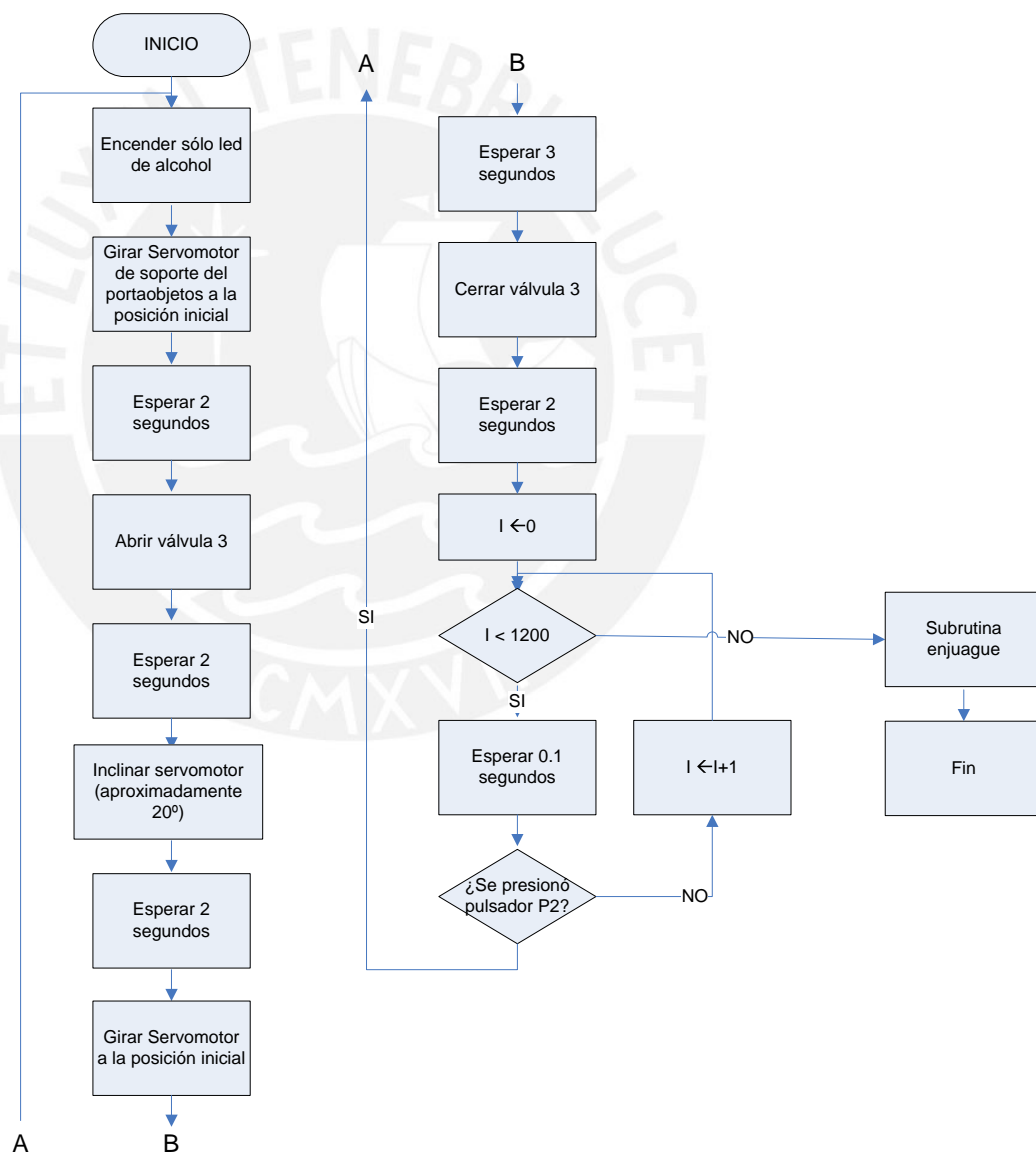


Figura 2.33: Diagrama de flujo de la subrutina alcohol

2.5.2.3 Subrutina azul de metileno

- Prende solamente el led que indica el procedimiento de azul de metileno.
- Se abre la válvula y empieza el goteo del reactivo.
- El portaobjetos realiza el movimiento de posición_inicial-inclinación-posición_inicial mientras realiza el goteo del reactivo.
- Se cierra la válvula.
- Se enfría un minuto y se enjuaga la muestra.

(Ver figura 2.34)

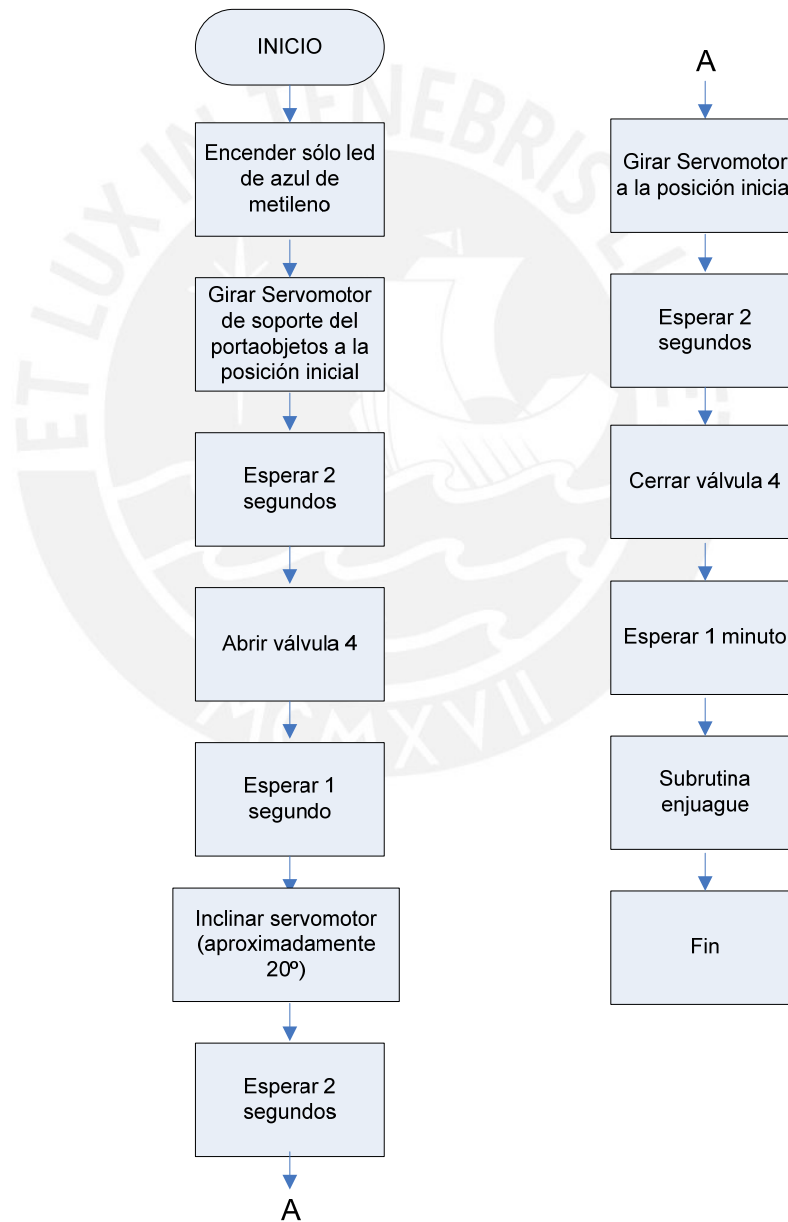


Figura 2.34: Diagrama de flujo de la subrutina azul de metileno

2.5.2.4 Subrutina enjuague

- Prende los leds que indican el procedimiento actual (fucsina, alcohol o azul de metileno) y el de enjuague.
- Inclinar el portaobjetos 45° para que caigan los desechos.
- Se abre la válvula y empieza el goteo del agua.
- Termina el tiempo de goteo y se cierra la válvula.

(Ver figura 2.35)

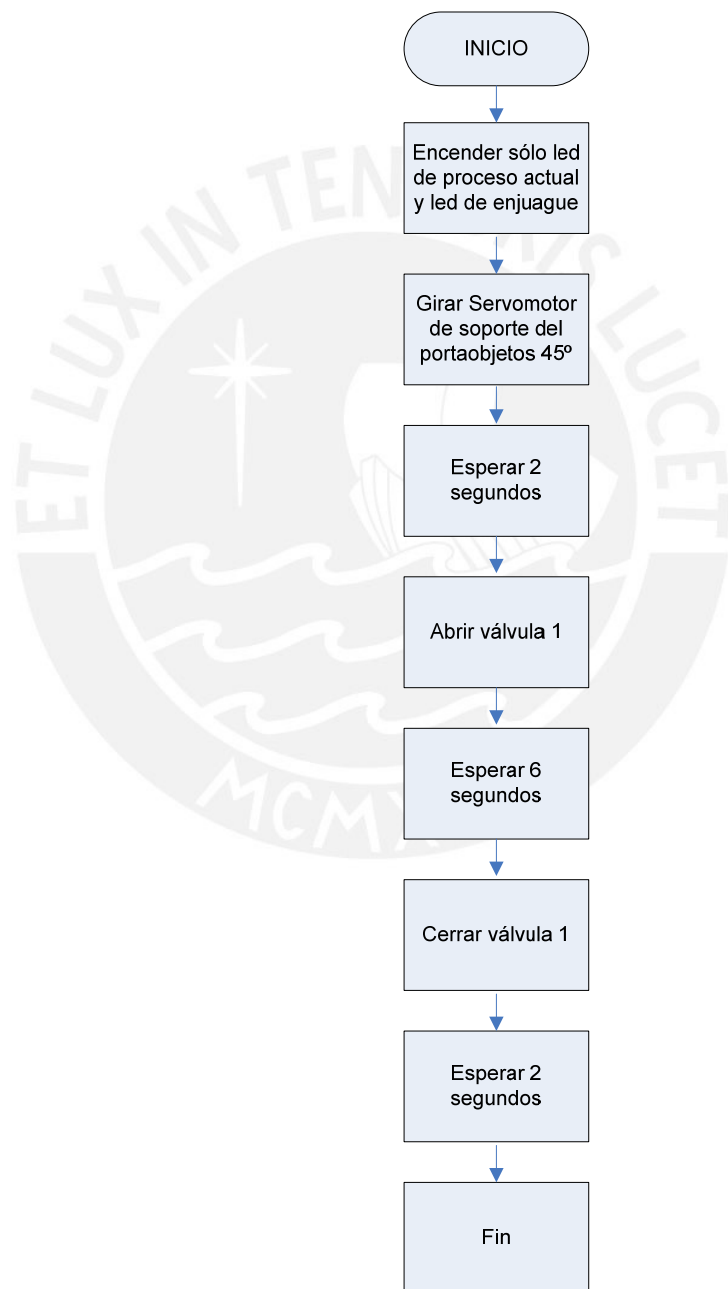


Figura 2.35: Diagrama de flujo de la subrutina enjuague

2.5.2.5 Subrutina calentador

- Prende los leds de los procedimientos fucsina y calentador.
- Ejecuta subrutina tiempo de calentamiento (empieza el calentamiento).
- Apaga el led del procedimiento calentador.
- Deja de calentar y espera 5 minutos.

(Ver figura 2.36)

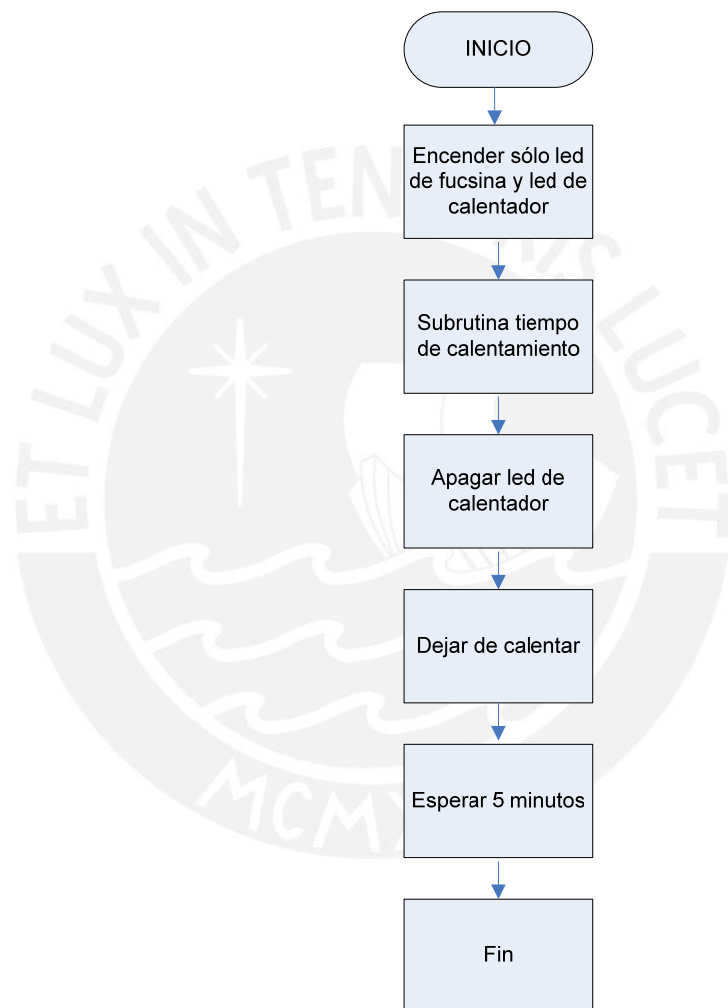


Figura 2.36: Diagrama de flujo de la subrutina calentador

2.5.2.6 Subrutina tiempo de calentamiento

- Tiene como variable la entrada tiempo.
- Empieza el calentamiento
- Se espera el tiempo definido por la variable.

(Ver figura 2.37)

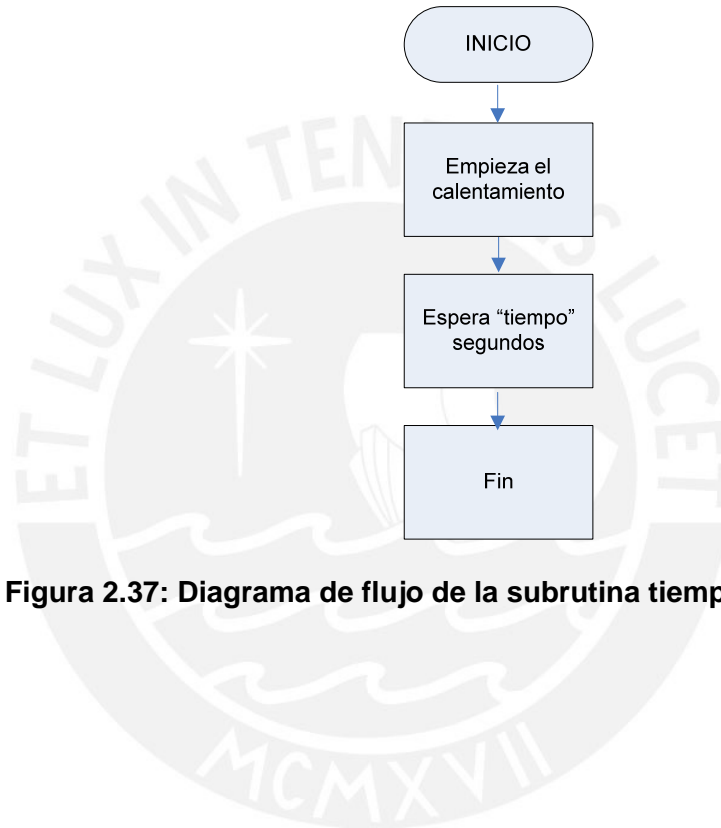


Figura 2.37: Diagrama de flujo de la subrutina tiempo de calentamiento

2.5.2.7 Subrutina finalizado

- Posiciona el portaobjetos en su posición estable-inicial.
- Prende y apaga el led de finalizado 10 veces, indicando el fin del teñido.

(Ver figura 2.38)

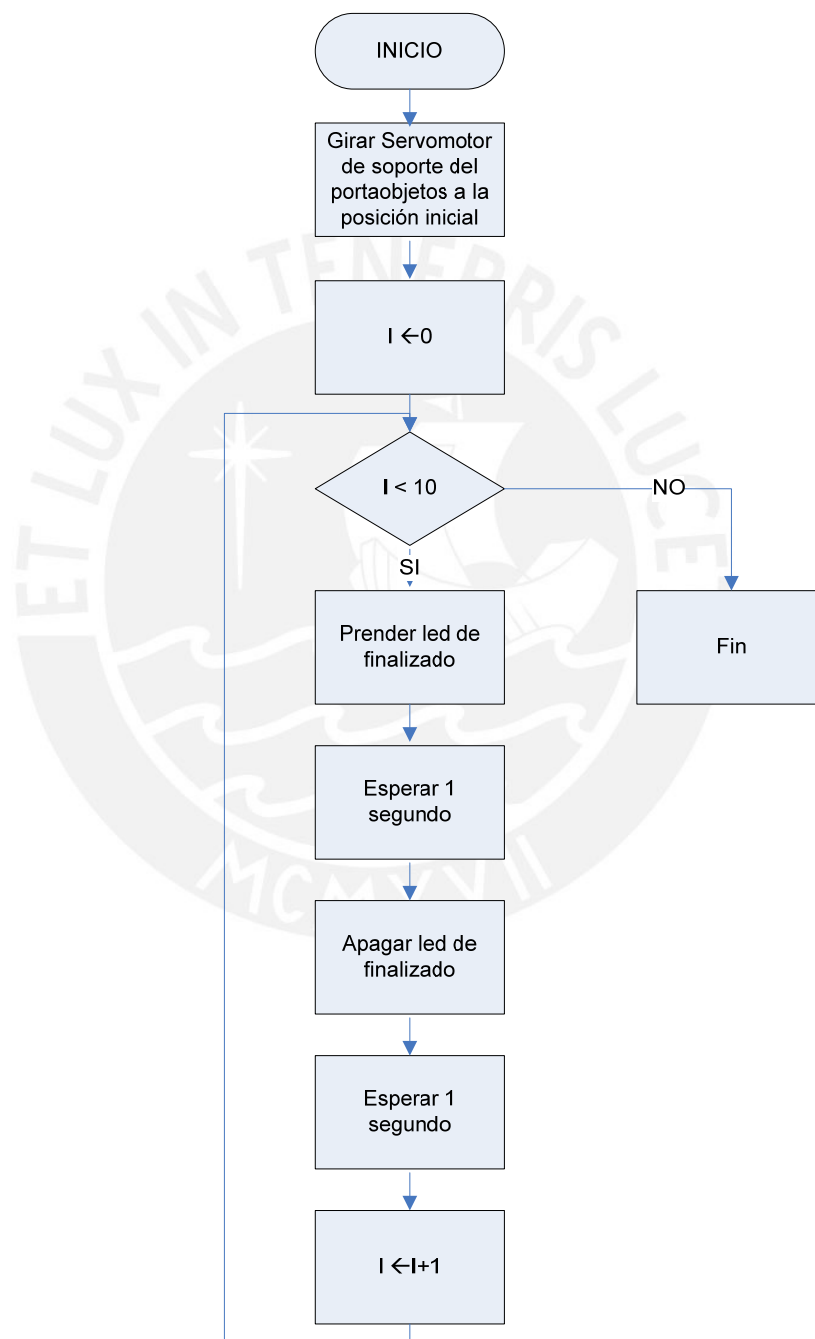


Figura 2.38: Diagrama de flujo de la subrutina finalizado

2.5.2.8 Subrutina testeo

- Abre las válvulas secuencialmente con un tiempo de espera de 1 segundo para la apertura y cierre de cada una.

(Ver figura 2.39)

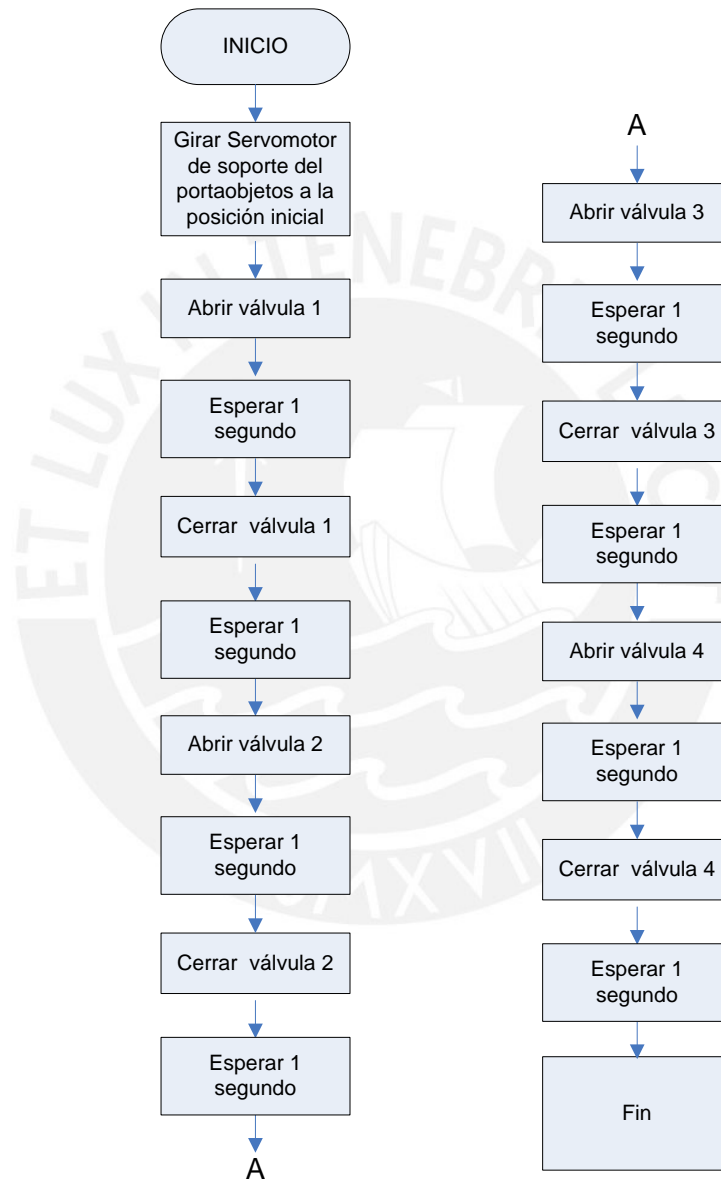


Figura 2.39: Diagrama de flujo de la subrutina testeo

CAPÍTULO 3

ENSAYOS A NIVEL DE EQUIPO

3.1 INTRODUCCIÓN

Se procedió a realizar los ensayos en el equipo para verificar el correcto funcionamiento de los componentes electrónicos y el funcionamiento total del sistema. A continuación se presentarán los ensayos realizados que corroboran el funcionamiento del equipo cumpliendo con las especificaciones investigadas para realizar el método de tinción de Ziehl Neelsen.

3.2 ENSAYOS Y RESULTADOS

3.2.1 ENSAYOS DE LA FUENTE DE ALIMENTACION

Con un multímetro se verificó el voltaje de la fuente de alimentación, alrededor de los 24 V.

Especificaciones de la fuente de alimentación:

- Voltaje DC: 24 V
- Corriente nominal: 2.5 A
- Rango: 0-2.5 A
- Potencia: 60 W
- Rizado: 150 mVpp
- Peso: 260 g



Figura 3.1: Ensayo de la Fuente de Alimentación

3.2.2 ENSAYO DEL CALENTADOR CERÁMICO Y TERMISTOR

Se procederá a comprobar que el termistor EPCOS 100K, de la serie B57560G, usado para monitorear la temperatura nos proporciona una lectura correcta de datos comparando las mediciones realizadas con la sonda infrarroja de temperatura 80T-IR (ver figura 3.3), prestado del almacén de electrónica.

En la tabla 3.1 se muestran las mediciones realizadas con el termistor EPCOS 100K y la sonda infrarroja de manera simultánea a lo largo del tiempo mientras el calentador cerámico se encuentra funcionando.

Los siguientes cálculos se basarán en la hoja de datos del termistor EPCOS 100K adjuntada en los anexos.

Tabla 3.1

Resistencia medida con el termistor EPCOS 100K	Temperatura equivalente del termistor EPCOS 100K	Temperatura medida con la sonda infrarroja 80T-IR	Diferencia de temperatura (°C)
70.9	33.2	33.1	0.1
66	34.5	34	0.5
65.9	35.4	34.7	0.7
69.5	36.8	36.3	0.5
52.6	40	39.2	0.8
45.8	43.5	42.9	0.6
42.2	45.4	45	0.4
35.3	50.1	49.1	1
38.2	52.5	52.2	0.3
28.1	55.9	55	0.9
23.7	61.4	60.5	0.9

Fuente: Elaboración Propia

Las medidas con la sonda se efectuaron a una distancia de 10 cm debido a las consideraciones del instrumento.

Como se puede observar se tiene una diferencia de temperatura menor a 1°C entre ambos sensores, por lo cual podemos corroborar que la temperatura medida por el termistor EPCOS 100k es correcta con un error menor a 1°C, debido a que se ha comprobado con un sensor calibrado.



Figura 3.3: Sonda infrarroja de temperatura 80T-IR

3.2.3 PRUEBA DE FILTRADO DE AGUA

Se probó si en los recipientes no filtraban el líquido por verificación visual. En aquellos que se filtraba, se volvían a sellar y se repetía el proceso.

Las últimas tres pruebas que se realizaron por recipiente tuvieron duración de aproximadamente 30 minutos por prueba, en las cuales se probó que no se filtraba el líquido. (Ver figura 3.4)



Figura 3.4: Prueba de filtrado de agua

3.2.4 FUNCIONAMIENTO DE LAS ELECTROVÁLVULAS CONECTADAS AL RECIPIENTE

Por principio de hidrodinámica, cuando se presenta una presión mayor en un lado de la manguera, el agua empezará a fluir por el otro lado. En este caso se puede apreciar claramente que la manguera conectada al recipiente tiene una mayor presión producida por el peso del líquido contenido en el mismo.

Se realizó la prueba energizando la válvula e inmediatamente empezaba a gotear en el otro lado de la manguera, lo que corroboró la teoría. (Ver figura 3.5)



Figura 3.5: Prueba del sistema electroválvulas-recipiente

3.2.5 FUNCIONAMIENTO DE LAS ELECTROVÁLVULAS EN EL EQUIPO

Se probó el funcionamiento de las válvulas conectadas al equipo, para lo cual se realizó un programa que abría de manera secuencial las válvulas (subrutina calibración) y se corroboró que efectivamente el voltaje necesario de 12 V era proporcionado a la salida del regulador y abría la electroválvula. (Ver figura 3.6)

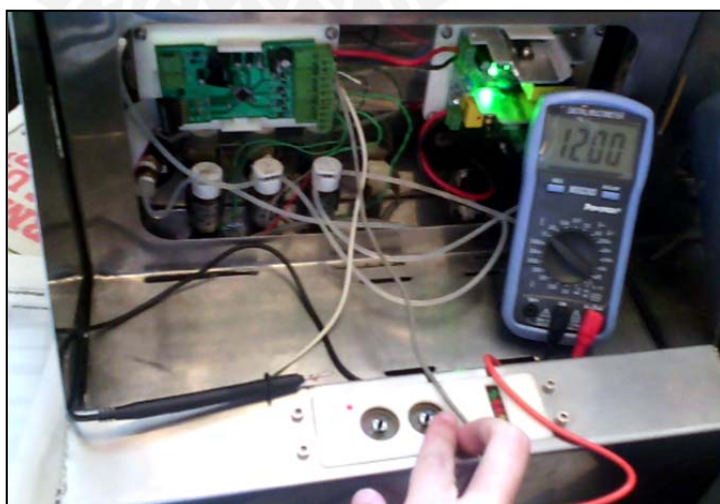


Figura 3.6: Prueba de las electroválvulas en el equipo

3.2.6 CALENTAMIENTO DE LA MUESTRA:

Debido a que el equipo usa un calentador cerámico para realizar la etapa de calentamiento de la muestra, el tiempo necesario del calentamiento para llegar a una temperatura entre 60°C y 70°C que es aproximadamente la temperatura provocada por el mechero, era mayor que el tiempo en el método manual.

Se realizaron pruebas con el termistor EPCOS 100K monitoreando la temperatura para llegar a la deseada. Estas pruebas se iniciaron a temperatura ambiente de 25°C. En la tabla 3.1 se muestran las pruebas realizadas

Tabla 3.1: Prueba de calentamiento de la muestra

Número de prueba	Tiempo que demora en calentar entre 55°C y 60°C (segundos)
1	80
2	82
3	79
4	78
5	80

Fuente: Elaboración propia

Debido a que el calentador cerámico se enfría lentamente se debe esperar un tiempo de aproximadamente 10 minutos una vez que deja de calentar, para volver a iniciar otro calentamiento a partir de una temperatura ambiente (25°C).

En la tabla 3.2 se muestran las pruebas de enfriamiento que se realizaron.

Tabla 3.1: Prueba de enfriamiento de la muestra

Número de prueba	Tiempo que demora en enfriar de 60°C a 25°C
1	9 min 20 s
2	9 min 25 s
3	9 min 33 s
4	9 min 23 s
5	9 min 27 s

Fuente: Elaboración Propia

3.2.7 FUNCIONAMIENTO COMPLETO DEL EQUIPO

Finalmente, se probó el funcionamiento completo del equipo, para lo cual, se tuvo que modificar la programación que se había proporcionado, debido a un error que no permitía abrir todas las electroválvulas, modificar el tiempo de calentamiento, debido a que sobrepasaba los 60°C, modificar los tiempos de enfriamiento acorde a lo establecido en el método de tinción explicado en el manual del INS, y también cambiar la inclinación del servomotor, debido a que el líquido vertido sobre la muestra se desplazaba hacia una esquina. En base a la primera visita que se realizó al Hospital 2 de Mayo, se comparó el tiempo que realizaba el laboratorista con el tiempo realizado por el equipo. Habiendo realizado los cambios, los tiempos se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Tiempos de ejecución de cada etapa

Proceso	Tinción realizado de manera manual	Tinción realizada de manera automática
Fucsina	Tiempo de goteo: 5 s	Tiempo de giro del servomotor: 0.5 s
		Tiempo de espera: 2 s
	Tiempo de calentamiento: 15 s	Tiempo de goteo: 5 s
		Tiempo de espera: 2 s
	Tiempo de enfriamiento: 5 min	Tiempo de calentamiento: 80 s
		Tiempo de enfriamiento: 5 minutos 2 segundos
Enjuague	Tiempo de enjuague: 10 s	Inclinación del servomotor: 2 s
		Tiempo de goteo: 6 s
		Tiempo de espera: 2 s
Alcohol ácido	Tiempo de goteo: 5 s	Tiempo de giro del servomotor: 0.5 s
		Tiempo de espera: 2 s
	Tiempo de enfriamiento: 2 min	Tiempo de goteo: 7 s
		Tiempo de espera: 2 s
		Tiempo de enfriamiento: 2 min 1 segundo

Proceso	Tinción realizado de manera manual	Tinción realizada de manera automática
Enjuague	Tiempo de enjuague: 10 s	Inclinación del servomotor: 2 s
		Tiempo de goteo: 6 s
		Tiempo de espera: 2 s
		Tiempo de espera: 2 s
Azul de metileno	Tiempo de goteo: 5 s	Tiempo de giro del servomotor: 0.5 s
		Tiempo de espera: 2 s
	Tiempo de enfriamiento: 1 min	Tiempo de goteo: 5 s
		Tiempo de espera: 2 s
Tiempo de enfriamiento: 1 min		
Tiempo total	8 minutos 50 segundos	10 minutos 15 segundos

Fuente: Elaboración propia

Nota: Las pruebas se hicieron con agua.

Como se pudo observar el tiempo de goteo varía para el alcohol ácido. Esto se debe a que la cantidad vertida debe ser mayor para limpiar la fucsina restante que no tiñó la muestra.

Los tiempos de espera se programaron para que el servomotor tenga el tiempo necesario de posicionarse, antes de que empiecen y dejen de caer las gotas de los reactivos.

En consenso, el tiempo total ejecutado por el equipo es mayor al tiempo manual, sin embargo, tiene un mayor beneficio al ser un proceso automatizado, previniendo de posibles contagios a los laboratoristas al estar en contacto con la muestra.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS DE VALIDACIÓN

4.1 INTRODUCCIÓN

La validación de un equipo es un proceso de mejora continua, en el cual se parte de la información obtenida de una investigación y luego se procede a trabajar en conjunto con una persona especialista en el tema, la cual, mediante una serie de pruebas, puede determinar si efectivamente el equipo es válido o no para el propósito el cual ha sido fabricado.

Una vez que se corroboró que el equipo estaba en funcionamiento, se procedió a realizar la validación del mismo, trabajando en conjunto con el Departamento de Patología Clínica y Anatomía Patológica del Hospital Nacional Dos de Mayo, en el cual se realizaron dos visitas y recibimos una en la universidad, de parte de la doctora Luz Huaroto perteneciente al laboratorio de microscopía, donde se realiza el análisis de todo tipo de muestras para su diagnóstico de TBC.

La primera visita se realizó sin el equipo, debido a que se encontraba en la etapa de implementación, y tuvo como propósito observar el método de tinción de Ziehl Neelsen ejecutado por el laboratorista en una serie de muestras de esputo, de tal manera que se corroboró la información averiguada del método de tinción y se aprovechó en realizar una serie de preguntas para mejorar el funcionamiento del equipo.

La segunda visita la recibimos de parte de la doctora Luz Huaroto a la universidad, en la cual se le mostró el funcionamiento del equipo, explicándole durante el proceso las consideraciones que se han tenido para su calibración y recibiendo una retroalimentación de su parte, dándonos una serie de sugerencias para seguir mejorando el equipo PAME.

La tercera, cuarta y quinta visita se realizaron al laboratorio de microscopía del hospital con el equipo en funcionamiento. Estas visitas tuvieron como objetivo, en primer lugar, la calibración del equipo mediante una serie de ensayos con la ayuda del laboratorista, para luego, realizar las pruebas con muestras de esputo previamente elaboradas, a manera que se pueda hacer una comparación entre el método manual, ejecutado por el laboratorista, y el método automático, ejecutado por el equipo.

4.2 PRIMERA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO

La primera visita tuvo como propósito observar el procedimiento de tinción de Ziehl Neelsen con el fin de corroborar la información conocida del mismo.

Lo más resaltante que se pudo observar fue:

- El laboratorista seguía el procedimiento de tinción de acuerdo al manual del Instituto Nacional de Salud, lo cual confirmó que la teoría en la que se había basado para diseñar el equipo era la correcta.
- Los reactivos son guardados en recipientes de vidrio de color ámbar debido a que su continua exposición al sol (al estar cerca de la ventana) puede alterar su composición química, y por consiguiente, los resultados del experimento.
- Como ya se sabía, efectivamente, el calentamiento de la muestra después de aplicar la fucsina se realiza con un mechero, tres pasadas, cada una de 5 segundos de duración aproximadamente, que es el tiempo en que se aprecian los primeros humos de la muestra.

4.3 VISITA DE LA DOCTORA A LA UNIVERSIDAD

En la visita de la doctora a la universidad se le mostró el funcionamiento del equipo haciendo las pruebas con agua y colorantes naturales para diferenciar cada envase.

Para ese momento se había programado realizar sólo un calentamiento de la muestra.

Observaciones de la doctora:

- La inclinación del servomotor no era la necesaria debido a que las gotas que caían por la manguera se iban hacia una esquina y no cubrían la muestra.
- Es necesario un mayor tiempo de goteo, debido a que la cantidad de cada reactivo aplicado a la muestra es aproximadamente de 2 ml.
- Realizar tres veces el proceso de calentamiento es fundamental debido a que así está especificado en el manual del Instituto Nacional de Salud.
- Añadir la opción de repetir el proceso de alcohol ácido a criterio del laboratorista, debido a que a veces no es suficiente con la cantidad suministrada para decolorar la fucsina sobrante.

Para seguir las recomendaciones de la doctora, se realizaron una serie de pruebas y posteriormente se efectuaron los siguientes cambios:

- Los tres calentamientos se temporizaron a 50 segundos, 30 segundos y 25 segundos respectivamente.

- Se realizó una inclinación del servomotor de aproximadamente 10° respecto a su posición inicial.
- El tiempo de goteo de las válvulas se temporizó a 3.5 segundos para la fucsina y el azul de metileno y 7 segundos para el alcohol ácido, debido a que por indicación de la doctora, la cantidad de alcohol ácido es el doble que los otros reactivos.
- Se agregó la opción de repetir el proceso de alcohol ácido, que se puede efectuar durante los dos minutos de su etapa de enfriamiento si lo considera necesario el laboratorista, presionando el pulsador P2.

4.4 SEGUNDA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO

Debido a que el hospital tiene un protocolo riguroso en cuánto al ingreso de equipos y además, se encontraba realizando proceso de inventario, no se pudo coordinar una pronta visita, por lo cual, debido al tiempo restante, solamente se pudo realizar una visita más al hospital, ésta vez con el PAME para hacer las pruebas con muestras de esputo, tanto positivas como negativas, y efectuar la comparación con el método manual para verificar si el equipo estaba realizando el correcto teñido del frotis. (Ver figura 4.1)

Cabe mencionar que sería la primera prueba efectuada con los reactivos, debido a su difícil acceso y a su elevado costo.

En esta segunda visita, primeramente se realizó pruebas con agua, mostrándole el proceso a la laboratorista de tal manera que diera sugerencias para mejorar el equipo o dé el visto bueno para proseguir a realizar las pruebas con los reactivos.

La laboratorista observó lo siguiente:

- Que la muestra no se estaba tiñendo correctamente, debido a que el líquido se quedaba concentrado en medio del extendido debido a que el diámetro de la manguera no permitía que el líquido cubra toda la muestra. Por otro lado, si durante el proceso de teñido, el soporte de la muestra mantenía una inclinación, el reactivo se vertía hacia un costado, con lo cual la tinción no se efectuaba de manera correcta.

Para solucionar el problema del teñido se programó al servomotor para mantenerse en su posición inicial estable durante dos segundos, luego realizar una leve inclinación (20°) durante 1 segundo y finalmente regresar a su posición estable, mientras el líquido seguía vertiendo durante dos segundo más. Así, la inclinación momentánea del

portaobjetos permitía esparcir el reactivo por la muestra sin llegar a escurrirse por un lado.

Una vez calibrado el equipo, se procedió a hacer la prueba con los reactivos. (Ver figura 4.2)



Figura 4.1: PAME en el hospital

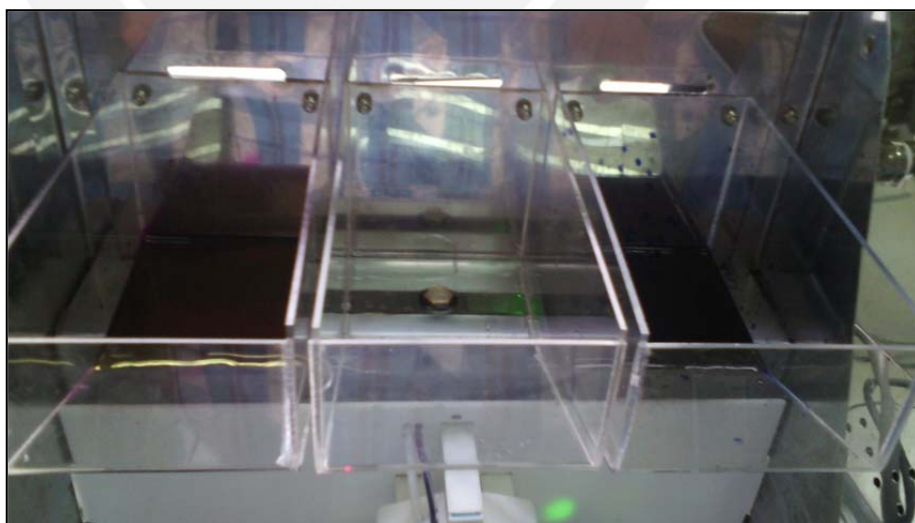


Figura 4.2: Reactivos colocados en los recipientes

Durante la prueba, se apreció que el líquido seguía sin cubrir toda la muestra, sin embargo, cubría una gran parte de ella, por lo cual, la laboratorista dio el visto bueno de que al parecer estaba tiñendo correctamente. Sin embargo, una vez finalizado el proceso, se apreció que la fucsina se había concentrado en un solo lugar, hacia una esquina de la muestra. (Ver figura 4.3)



Figura 4.3: a) Muestra de la izquierda teñida por el laboratorista, b) Muestra de la derecha teñida por el equipo

Esto se debió a que el tiempo de calentamiento y la cantidad del reactivo no fueron los necesarios para que la fucsina y el azul de metileno tiñeran la muestra de esputo.

Al querer repetir la experiencia, se observó que los recipientes del alcohol ácido y azul de metileno se habían rajado y el reactivo se estaba filtrando, por lo que se detuvo el experimento y se procedió a la limpieza del equipo.

Una posible explicación a esta ocurrencia puede deberse a la mezcla de los reactivos con el calor producido por el calentador y el calor interno del equipo que produjera que los recipientes se rajaran.

Debido a esta complicación no se continuó con el experimento, sin embargo, se piensa cambiar el material de los recipientes por acero inoxidable para continuar con la validación.

4.5 TERCERA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO

En la tercera visita se realizaron pruebas de calibración primeramente con agua, con la cual se tenía el inconveniente de que no llegaba a cubrir toda la muestra y cuando se agregaba más agua, ésta se desbordaba poco a poco hacia los costados del portaobjetos, quedando una película muy tenue de líquido sobre la lámina el cual era insuficiente. El fenómeno también se repitió cuando se probó con los reactivos.

Esto se debe a la propiedad de los líquidos llamada tensión superficial, lo cual explica el fenómeno físico de la cohesión o atracción de las moléculas de los líquidos hacia los bordes de la superficie del portaobjetos. (Ver figura 4.4)



Figura 4.4: Lámina de vidrio sobre el soporte del portaobjetos

Cambios realizados en el equipo:

Para solucionar el problema, se replicó el procedimiento seguido por el laboratorista en el cual la lámina es colocada sobre dos varillas encontrándose libre de superficie alguna en su perímetro.

Se procedió a elevar la muestra en 5 mm colocando una placa de acero inoxidable que se mandó confeccionar cuyas medidas son de 46 mm de largo , 20 mm de ancho , y 5 mm de espesor (ver figura 4.5) y soportes hechos de alambre para sujetar la muestra al momento de la inclinación, con lo cual el canal creado a los costados y el reactivo

sobre la muestra no estaban en contacto por lo que no ocurría el fenómeno de cohesión entre ellos y por lo tanto la adhesión de los reactivos a la lámina de vidrio era posible. (Ver figura 4.6)



Figura 4.5: Placa de acero inoxidable

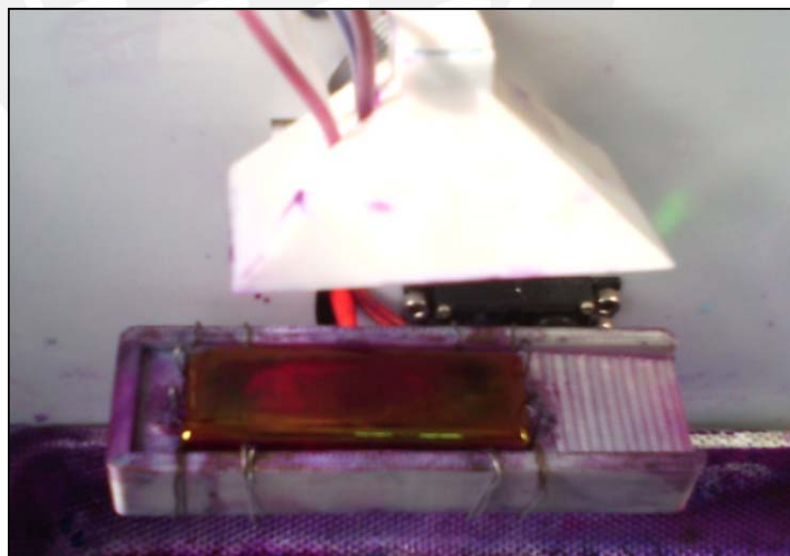


Figura 4.6: Elevación de la lámina de vidrio consiguiendo la adhesión del reactivo sobre la misma

Se mandaron a confeccionar tres envases de acero inoxidable que sustituyeran a los envases de acrílico debido a que estos se rajaron con el contenido de los reactivos lo que originó que se filtrara el líquido sobre los componentes electrónicos. (Ver figura 4.7)



Figura 4.7: Envases de acero inoxidable

Debido a que los envases se encontraban atornillados a la estructura del equipo lo cual no facilitaba la manipulación de los mismos en cuanto al vaciado de los reactivos y a la limpieza, se procedió a confeccionar agarradores portátiles de acero. (Ver figuras 4.8 y 4.9)



Figura 4.8: Agarradores portátiles de acero inoxidable



Figura 4.9: Envases con los agarradores portátiles

Se cambiaron las mangueras por unas de mayor longitud que permitieran la manipulación de los envases para realizar el vaciado del contenido ya que las originales eran muy cortas. (Ver figuras 4.10 y 4.11)



Figura 4.10: Instalación de mangueras de mayor longitud

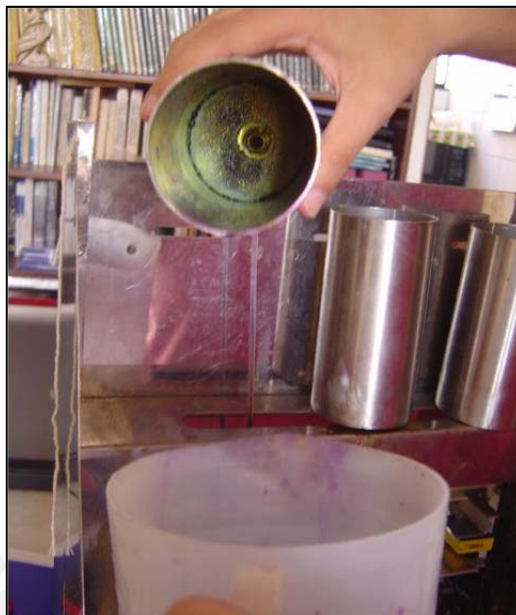


Figura 4.11: Demostración del vaciado de los envases

4.6. CUARTA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO

Primeramente se determinó la cantidad necesaria de reactivo para cubrir toda la lámina. Se determinó que con 20 segundos de goteo para cada reactivo, aproximadamente 5 ml de cada uno, era suficiente para cubrir el extendido.

Se procedió a realizar la comparación entre la tinción manual y la tinción ejecutada por el equipo:

- 1) Tinción con fucsina fenicada básica de manera manual y de manera automática, ver figuras 4.12 y 4.13.

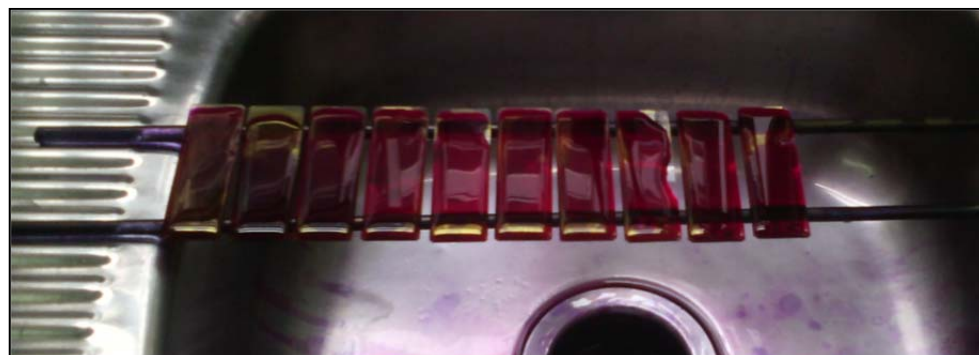


Figura 4.12: Tinción de manera manual con fucsina fenicada básica

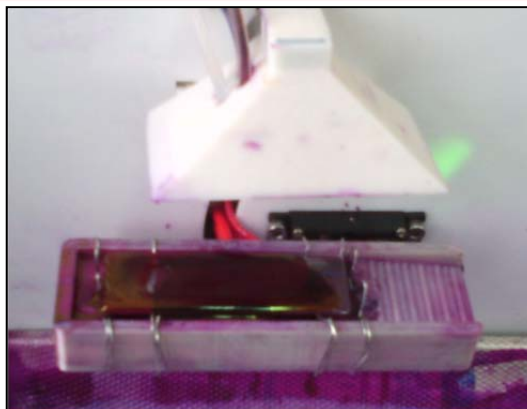


Figura 4.13: Tinción de manera automática con fucsina fenicada básica

- 2) Decoloración con alcohol ácido de manera manual y de manera automática, ver figuras 4.14 y 4.15

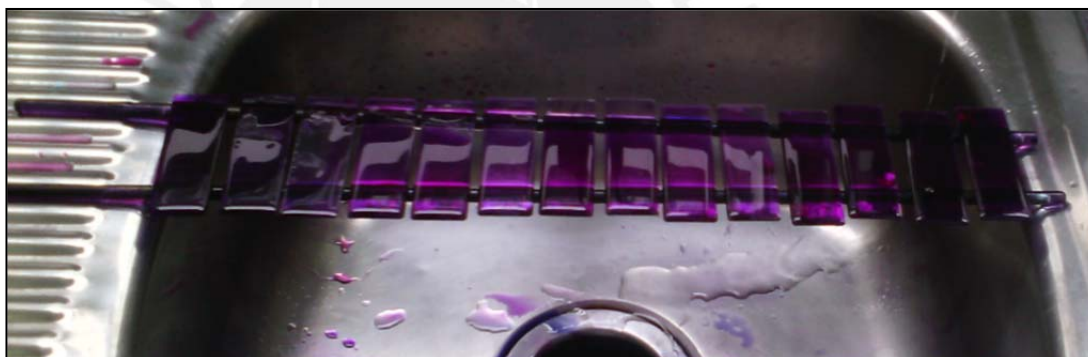


Figura 4.14: Decoloración de manera manual con alcohol ácido

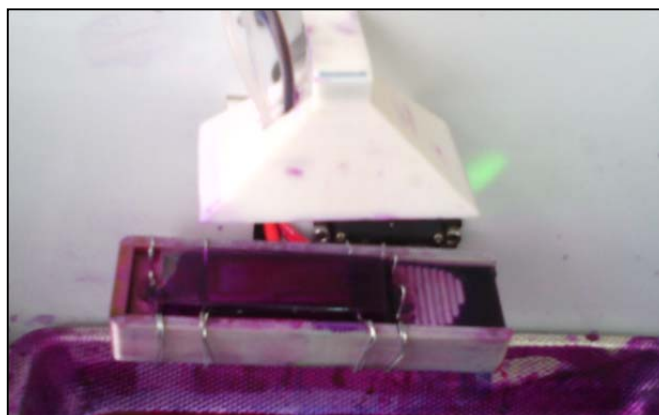


Figura 4.15: Decoloración de manera automática con alcohol ácido

- 3) Tinción con azul de metileno de manera manual y manera automática, ver figuras 4.16 y 4.17



Figura 4.16: Tinción de manera manual con azul de metileno

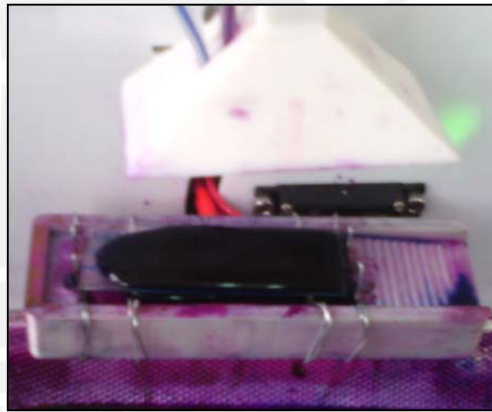


Figura 4.17: Tinción de manera automática con azul de metileno

Una vez calculado el reactivo necesario para cubrir la muestra se realizó el procedimiento completo con el equipo.

Primera prueba: Lámina negativa # 584:

Se procedió a realizar la tinción de la muestra con los parámetros mostrados en la tabla 4.1:

Tabla 4.1: Primera prueba con la lámina negativa #584

Tiempo de goteo de la fucsina	20 segundos
Mililitros de fucsina	5 ml
Tiempo de goteo del alcohol ácido	20 segundos
Mililitros de alcohol ácido	5 ml
Tiempo de goteo del azul de metileno	20 segundos
Mililitros de azul de metileno	5 ml
Tiempo de calentamiento	80 segundos
Temperatura máxima	57 °
Tiempo de enjuague	18 segundos

Fuente: Elaboración Propia

Se observaron rastros de fucsina por lo cual, con la laboratorista se llegó a la conclusión de que el proceso de decoloración no se estaba llevando a cabo de manera eficiente, así que la laboratorista sugirió duplicar el proceso de decoloración, es decir, duplicar el proceso de alcohol ácido. (Ver figura 4.18)

Segunda prueba: Lámina negativa # 584

Se procedió a realizar la tinción de la muestra con los parámetros mostrados en la tabla 4.2:

Tabla 4.2: Segunda prueba con la lámina negativa #584

Tiempo de goteo de la fucsina	20 segundos
Mililitros de fucsina	5 ml
Tiempo de goteo del alcohol ácido	40 segundos
Mililitros de alcohol ácido	10 ml
Tiempo de goteo del azul de metileno	20 segundos
Mililitros de azul de metileno	5 ml
Tiempo de calentamiento	80 segundos
Temperatura máxima	57 °
Tiempo de enjuague	18 segundos

Una vez duplicado el proceso de alcohol ácido se realizó la prueba con otra muestra del mismo paciente y coloreó bien la muestra, quedando solamente el azul de metileno, lo cual se corroboró con el análisis en el microscopio. (Ver figura 4.18)

Tercera prueba: Lámina negativa # 584

Se hizo una tercera prueba para verificar el procedimiento y efectivamente había coloreado bien la lámina. (Ver figura 4.18)



Figura 4.18: De izquierda a derecha: a) lámina antes de la tinción, b) primera prueba, c) segunda prueba, d) tercera prueba

Cuarta y quinta prueba: Lámina positiva # 242, 3 cruces

Con los parámetros anteriores se realizaron dos pruebas, en las cuales después del análisis microscópico el laboratorista observó que los bacilos no se habían teñido bien, la coloración de fucsina era muy tenue.

Se discutió con el laboratorista la posible causa y se sugirió aumentar el tiempo de calentamiento, ya que posiblemente no era el necesario para que la fucsina coloree al bacilo.

Se procedió a realizar la tinción de la muestra con los parámetros mostrados en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Pruebas con las láminas positivas #242, 3 cruces

Tiempo de goteo de la fucsina	20 segundos
Mililitros de fucsina	5 ml
Tiempo de goteo del alcohol ácido	20 segundos
Mililitros de alcohol ácido	5 ml
Tiempo de goteo del azul de metileno	20 segundos
Mililitros de azul de metileno	5 ml
Tiempo de calentamiento	105 segundos
Temperatura máxima	65 °
Tiempo de enjuague	18 segundos

Fuente: Elaboración Propia

La tinción de la muestra realizada por el laboratorista y las tinciones realizadas por el equipo se muestran en la figura 4.19.



Figura 4.19: De izquierda a derecha: a) lámina teñida por el laboratorista, b) primera prueba con el equipo, c) segunda prueba con el equipo

En las figuras 4.20 y 4.21 se muestran las vistas en el microscopio de la muestra #242 antes y después de modificar el tiempo de calentamiento.

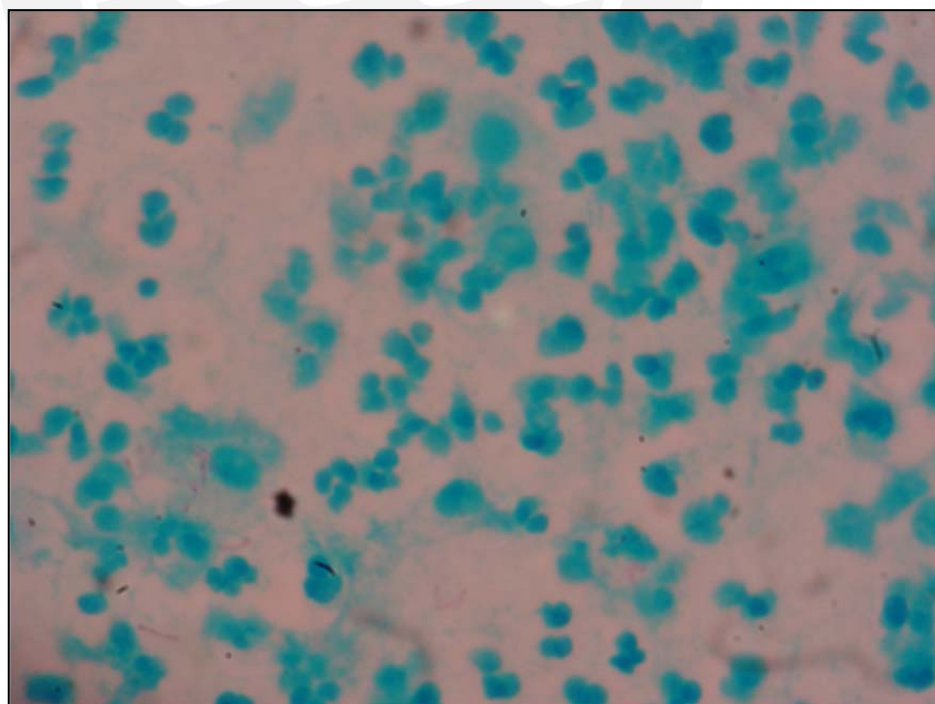


Figura 4.20: Vista del microscopio antes de modificar el tiempo de calentamiento

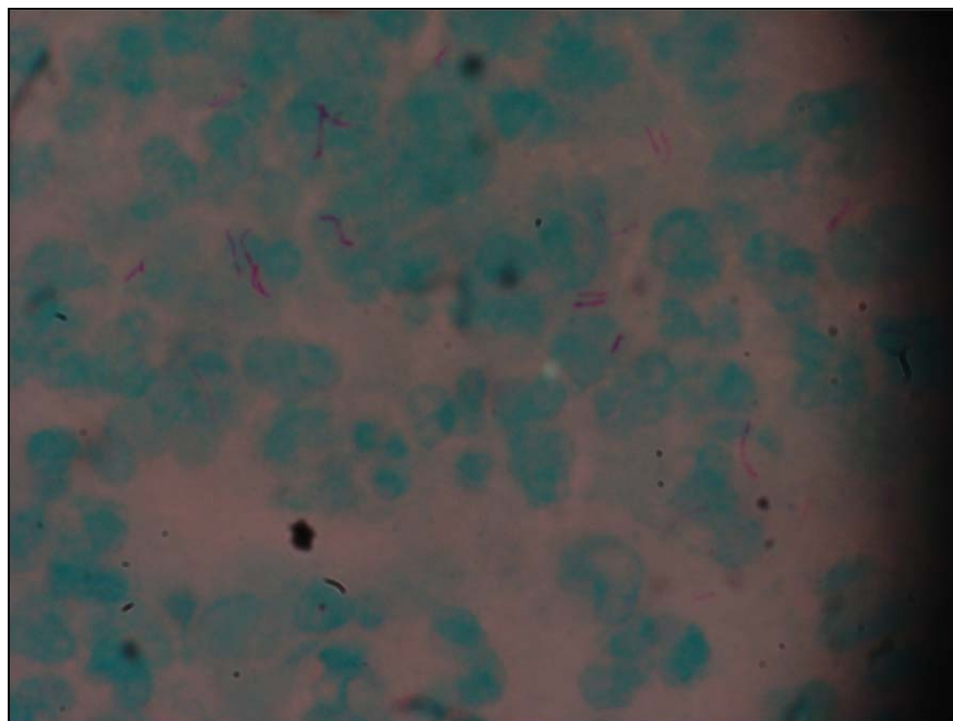


Figura 4.21: Vista del microscopio después de modificar el tiempo de calentamiento

4.7 QUINTA VISITA AL HOSPITAL DOS DE MAYO:

Se realizaron pruebas en muestras tanto positivas como negativas. Ver figuras 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 y 4.27.



Figura 4.22: Pruebas realizadas a la muestra #242



Figura 4.23: Muestra positiva con tres cruces, tuberculosis severa

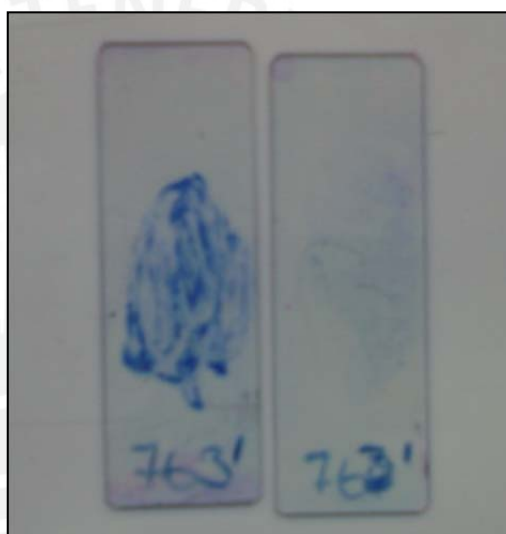


Figura 4.24: Muestra negativa



Figura 4.25: Muestra positiva con 1 cruz, tuberculosis leve



Figura 4.26: Muestra positiva con 1 cruz, tuberculosis leve

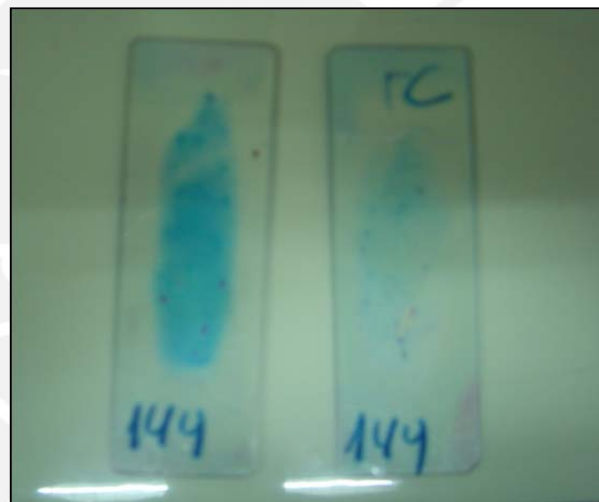


Figura 4.27: Muestra negativa

En la tabla 4.4 se muestran los resultados de los 11 ensayos que se realizaron en la quinta visita al Hospital Dos de Mayo:

Tabla 4.4: Ensayos con muestras de esputo

Muestra	Ensayo	Diagnóstico manual	Diagnóstico de equipo	¿Éxito?
#242	1	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí
#242	2	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí
#242	3	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí
#242	4	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí
#242	5	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí
#242	6	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí
#378	7	Muestra positiva con 3 cruces	Muestra positiva con 3 cruces	Sí
#763	8	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí
#12557	9	Muestra positiva con 1 cruz	Muestra positiva con 1 cruz	Sí
#744	10	Muestra positiva con 1 cruz	Muestra positiva con 1 cruz	Sí
#144	11	Muestra negativa	Muestra negativa	Sí

Fuente: Elaboración propia

Como se observa se obtuvo el mismo resultado en el diagnóstico manual y el diagnóstico del equipo, por lo cual se obtuvo un porcentaje de éxito del 100%.

% Éxito = 100%

CONCLUSIONES

1. Durante la etapa de validación se implementaron ciertos cambios en el equipo que permitieron realizar el proceso de tinción de Ziehl Nielsen con los siguientes resultados: se realizaron 11 pruebas con 11 muestras, de las cuales 6 eran positivas de 3 cruces de un paciente, 1 positiva de 3 cruces, 2 positivas con 1 cruz y 2 negativas de diferentes pacientes, con las cuales se obtuvieron buenos resultados.
2. Se concluyó que no es conveniente el uso de un recipiente grande para contener los reactivos, debido a que diariamente se usa poco reactivo para teñir las muestras.
3. Se logró temporizar las diferentes etapas del método de tinción de Ziehl Neelsen con un error menor al 1%, así como tener un control preciso de los tiempos de goteo y del calentamiento. Esto se consiguió gracias al uso de un microcontrolador que trabaja en el orden de los MHz.
4. Se consiguió la precisión de la inclinación de la muestra, lo cual ayudó grandemente al esparcimiento de los reactivos sobre la misma, debido al uso de un servomotor.
5. Se logró automatizar el calentamiento de la muestra gracias al uso de un calentador cerámico, el cual se temporizó para llegar a la temperatura deseada, con lo cual, se automatiza en su totalidad el proceso de tinción de Ziehl Neelsen.
6. Acorde al resultado de las 11 pruebas se puede concluir que no siempre es indispensable realizar tres calentamientos a la muestra, con un calentamiento se obtuvieron buenos resultados.
7. Se debe aumentar el diámetro de la manguera como mínimo al doble, para que el reactivo cubra toda la muestra.
8. El tiempo de tinción del equipo es mayor que el tiempo de tinción realizado manualmente, sin embargo, evita la interacción directa del laboratorista con la muestra durante la tinción, el cuál era el objetivo principal.
9. Se creó el prototipo de un equipo que realiza el método de tinción de muestras de esputo de Ziehl Neelsen de manera automática, faltaría adaptar el diseño del

soporte del portaobjetos acorde a lo especificado y pasar por la prueba de uso y desgaste para verificar su rendimiento.



RECOMENDACIONES

1. El prototipo diseñado sólo permite la tinción de una muestra a la vez, lo cual representa una desventaja frente a la tinción realizada por el laboratorista. Por tal motivo, se sugiere realizar las modificaciones necesarias que permitan la tinción de varias muestras en simultáneo.
2. Considerar el análisis de otro tipo de material para el envase del alcohol ácido debido a que el envase de acero inoxidable implementado sufrió daños de corrosión.
3. Impermeabilizar el área de las conexiones electrónicas que se encuentran debajo de los recipientes y mangueras de salida de los reactivos, así como también el contorno de la lámina de aluminio colocada en el portaobjetos, a fin de evitar posibles filtraciones que puedan dañar estas conexiones.
4. La universidad debe tener sus propios reactivos para realizar pruebas previas y analizar el contenedor más adecuado.
5. Debe estudiarse la reacción de los contenedores con los reactivos, no solamente en su resistencia a la corrosión, sino también en su absorción, con el fin de no desperdiciar reactivos.
6. Con el fin de realizar una validación más asertiva, debería realizarse un estudio estadístico para establecer un límite de confianza y determinar cuál es el mínimo número de muestras a analizar, para asegurar efectivamente que el equipo realiza o no una buena tinción.
7. El recipiente tiene un sello de goma para que no filtre el agua, el cual tiene un nivel considerable y el reactivo necesita estar por encima de ese nivel para empezar a fluir por la manguera. Para evitar el desperdicio del reactivo, se recomienda diseñar un recipiente con una base más pequeña, o instalar un sello de goma de menor altura.

BIBLIOGRAFIA

ATMEL

- (2014) Estudio del diseño de sistemas embebidos. Sitio web de la empresa ATMEL
(consulta: 20 de octubre de 2014)
(http://www.atmel.com/microsite/atmel_studio6/default.aspx)

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS)

- (1995) Sitio web oficial del INS; contiene publicación del Manual de Normas y Procedimientos en Bacteriología de Tuberculosis del Ministerio de Salud
(consulta: 10 de octubre de 2014)
(http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/10.pdf)

MENDOZA, Jorge

- (2011) Desarrollo de un equipo automático de lectura de placas MODS para el diagnóstico rápido de tuberculosis y determinación de susceptibilidad de drogas. Tesis, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú. En: Repositorio Digital de Tesis UNI, 2011 (consulta: 13 de noviembre de 2014)
(<http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/938>)

MUTUA DE LA AGRUPACION DE PROPIETARIOS DE LAS FINCAS RUSTICAS DE ESPAÑA (MAFRE)

- (2007) Guías de seguridad sobre la corrosión. Sitio web de la empresa MAFRE
(consulta: 20 de octubre de 2014)
(http://www.mapfre.com/documentacion/publico/i18n/catalogo_imagenes/grupo.cmd?path=1030514)

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD

- (2008) Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis: Parte I: Baciloscopía [en línea]. Normas y guía técnica. 2008.
(consulta: 15 de octubre de 2014)
(<http://files.sld.cu/tuberculosis/files/2009/12/tb-labs-baciloscopía1.pdf>)

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS)

(2014) Descripción del Xpert MTB/Rif, países en los que se usa y recomendaciones para su utilización (consulta: 15 de setiembre de 2014)

(http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24334&Itemid=)

PORTILLO, Zoraida

(2010) Perú: crean sistema de telediagnóstico de tuberculosis. En: Organization Science and Development Network (Scidev.net) (consulta: 10 de octubre de 2014)

(<http://www.scidev.net/america-latina/salud/noticias/per-crean-sistema-de-telediagn-stico-de-tuberculosis.html>)

VICENTE, Miguel

(2010) Un paso más hacia el diagnóstico rápido de la tuberculosis. En: Blog madri+d, 26 de setiembre de 2010 (consulta: 13 de noviembre de 2014)

(<http://www.madrimasd.org/blogs/microbiologia/2010/09/26/130999>)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)

(2014) Frequently Asked Questions on Xpert MTB/RIF assay. Sitio web de la Organización Mundial de la Salud (consulta: 20 de setiembre de 2014)

(http://www.who.int/tb/laboratory/xpert_faqs.pdf)