

**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS  
ANTITUBERCULOSIS**



ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN .....	5
II.	FINALIDAD .....	6
III.	OBJETIVO.....	6
IV.	ÁMBITO DE APLICACIÓN.....	6
V.	BASE LEGAL.....	6
VI.	CONTENIDO.....	6
6.1	DEFINICIONES OPERATIVAS .....	6
6.2	SIGLAS .....	8
6.3	TRANSPORTE, RECEPCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS.....	9
6.3.1	Transporte de muestras: .....	9
6.3.2	Recepción de muestras:.....	11
6.3.3	Conservación de muestras: .....	11
6.4	PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO CON INDICADOR DE CRECIMIENTO DE MICOBACTERIAS .....	11
6.4.1	Fundamento.....	11
6.4.2	Condiciones previas.....	12
A.	Infraestructura y bioseguridad .....	12
B.	Equipos, materiales y reactivos .....	12
C.	Condiciones de la muestra.....	14
6.4.3	Procedimiento.....	14
A.	Etapa pre analítica .....	14
B.	Etapa analítica.....	17
a)	Preparación del inóculo bacteriano para la prueba de sensibilidad .....	17
b)	Inoculación para prueba de sensibilidad .....	18



c) Inoculación para la prueba de sensibilidad de Pirazinamida .....	19
d) Ingreso del set de sensibilidad a la incubadora con lector de fluorescencia:..	20
C. Etapa post analítica.....	20
6.4.4 Control de Calidad .....	22
A. Control de calidad interno.....	22
B. Control de calidad externo.....	22
6.5 Sensibilidad a Drogas Mediante Observación Microscópica (MODS).....	23
6.5.1 Fundamento.....	23
6.5.2 Condiciones previas.....	23
A. Infraestructura y bioseguridad .....	23
B. Equipos, materiales y reactivos .....	24
C. Condiciones de la muestra.....	25
6.5.3 Procedimiento.....	26
A. Etapa pre-analítica.....	26
B. Etapa analítica .....	27
a) Procedimiento de descontaminación .....	27
b) Siembra en placas y en medio Löwenstein - Jensen.....	28
c) Preparación de las cepas control positivo – Control de calidad interno.....	28
C. Etapa post analítica.....	28
6.5.4 Control de Calidad .....	31
A. Control de calidad interno.....	31
B. Control de Calidad Externo .....	32
VII. RESPONSABILIDADES .....	32
VIII. ANEXOS .....	32
ANEXO 1: PREPARACIÓN DE LA ESCALA 0.5 Mc FARLAND .....	34
ANEXO 2: MÉTODO MODS .....	35
ANEXO 3: DISTRIBUCIÓN FINAL DE LA PLACA MODS.....	38



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

ANEXO 4: PREPARACIÓN DEL CALDO MIDDLEBROOK 7H9 PARA MODS .....	39
ANEXO 5: PREPARACIÓN DE BUFFER FOSFATO SALINO.....	40
ANEXO 6: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE (NaOH/CITRATO) .....	41
ANEXO 7: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE DROGAS PARA MODS .....	42
ANEXO 8: PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS.....	44
ANEXO 9: LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA MODS .....	46
ANEXO 10: CRIOCONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE LOS CULTIVOS MODS .....	48
ANEXO 11: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA PRUEBA DE SENSIBILIDAD EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO CON INIDICADOR DE CRECIMIENTO DE MICOBACTERIAS .....	49
ANEXO 12: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA LA PRUEBA MODS A.....	50
ANEXO 13: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA LA PRUEBA MODS B.....	53
ANEXO 14: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DEL CALDO MIDDLEBROOK 7H9 PARA MODS.....	55
ANEXO 15: FORMULARIO DE PRODUCTO FINAL Y CONTROL DE ESTERILIDAD DE MEDIO DE CULTIVO 7H9 PARA MODS .....	56
ANEXO 16: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DE BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) PARA MODS.....	57
ANEXO 17: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DE SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE PARA MODS.....	58
ANEXO 18: AJUSTES PARA CALCULAR LA POTENCIA DE LAS DROGAS .....	59
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	60



## I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que actualmente es la causa principal de muerte en adultos, a pesar de todos los avances en el diagnóstico y tratamiento continúa siendo una enfermedad de importancia en la salud pública y una amenaza al progreso mundial hacia el logro del nuevo objetivo para la eliminación de la TB de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Por otro lado, el descubrimiento de medicamentos antituberculosis ha constituido una de las armas de la medicina para contribuir al control de esta enfermedad; sin embargo, la emergencia de la resistencia a estos medicamentos y más aún de la multidrogorresistencia, están poniendo en riesgo los logros obtenidos a través de los años mediante los programas de control, basados en esquemas de tratamiento eficaces.

Las mutaciones responsables de la resistencia medicamentosa se producen con una baja frecuencia, pero constante, y esta frecuencia varía según el medicamento. La exposición al medicamento no induce a mutaciones, sino más bien permite la selección y replicación de los mutantes ya existentes, por destrucción de las bacterias sensibles que, de otra manera, competirían por los nutrientes.

La prueba de sensibilidad a drogas antituberculosis constituye una herramienta muy importante del laboratorio puesto que el resultado de esta prueba permite que el clínico elija el mejor esquema de tratamiento antituberculosis para el paciente con TB, por lo que se hace necesario que estas pruebas sean realizadas con los estrictos controles de calidad interno y externo, tanto por los laboratorios que lo ejecutan, como por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.

El propósito de este Manual es proporcionar al personal de laboratorio, información sobre los procedimientos técnicos para la detección de la resistencia a los medicamentos antituberculosis, así como la estandarización de los mismos. La aplicación de estas técnicas en buenas condiciones debe garantizar la validez de los resultados que se obtengan.

Por lo dicho anteriormente, la TB en el Perú es una enfermedad de estadísticas y números considerables, y merece especial énfasis aquella que presenta resistencia a alguna o más drogas utilizadas en el tratamiento indicado para combatirla. Por consiguiente, diferentes estrategias que puedan mitigar y controlar esta enfermedad son necesarias, todo con la finalidad de poder cumplir con los objetivos planteados por la OMS de poner fin a la epidemia de la TB y, sobre todo, de poder proporcionar alternativas de solución para mejorar la calidad de vida de nuestra población en general.

El "Manual de Pruebas de Sensibilidad a Drogas Antituberculosis" es una compilación de los métodos de sensibilidad más usados para evaluar el patrón de resistencia de las diferentes cepas aisladas de pacientes con TB; y es de ayuda inmediata y sencilla para el personal técnico y profesional de laboratorio.



## II. FINALIDAD

Estandarizar y proporcionar al personal de laboratorio de establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo del Perú, los procedimientos técnicos para la detección de la resistencia a los medicamentos antituberculosis.

## III. OBJETIVO

Dar a conocer, de forma clara y definida, los procesos estandarizados de las pruebas de sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) a drogas antituberculosis de primera y segunda línea.

## IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente Documento Técnico se aplica a los laboratorios de establecimientos de salud y servicios médicos de apoyo (Instituciones Prestadoras de Servicios de Salud-IPRESS) del Ministerio de Salud, a cargo de las Direcciones de Redes Integradas de Salud – DIRIS; y, de los Gobiernos Regionales, a cargo de las Direcciones Regionales de Salud – DIRESAs, Gerencias Regionales de Salud – GERESAs o las que hagan sus veces a nivel regional. Es de referencia para el Seguro Social de Salud – ESSALUD, Sanidad de Fuerzas Armadas, Sanidad de la Policía Nacional del Perú, Gobiernos Locales, y privadas, así como otras instituciones públicas o privadas que realicen pruebas de sensibilidad a drogas antituberculosis.

## V. BASE LEGAL

- Ley N° 26842, Ley General de Salud, y sus modificatorias.
- Decreto Legislativo N° 1161, Ley de Organización y Funciones del Ministerio de Salud, y sus modificatorias.
- Decreto Supremo N° 001-2003-SA, que aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud.
- Resolución Ministerial N° 715-2013/MINSA, que aprueba NTS N°104-MINSA/DGSP-V.01 "Norma Técnica de Salud para la Atención Integral de las Personas Afectadas por tuberculosis", y sus modificatorias.
- Resolución Ministerial N° 895-2018/MINSA, que aprueba la NTS N°143-2018/MINSA/DGIESP "Norma Técnica de Salud para la Prevención y Control de la Coinfección de la Tuberculosis y Virus de la Inmunodeficiencia Humana en el Perú".

## VI. CONTENIDO

### 6.1 DEFINICIONES OPERATIVAS

- **Agar:** Polisacárido complejo que en suspensión líquida se funde a 100° C y solidifica a 40° C adoptando la forma del recipiente (Ej. Placa Petri). El agar no es degradado ni utilizado como nutriente por los microorganismos, es utilizado para obtención de medios sólidos (1,5 – 2%) y semisólidos.
- **Baciloscopia:** Técnica para la observación de bacilo ácido alcohol resistente en frotis de muestras de esputo, teñidos por la técnica de Ziehl-Neelsen.
- **Buffer fosfato pH 6,8:** El tampón fosfato es un sistema muy eficaz para amortiguar ácidos, para mantener el pH de los medios biológicos dentro de los valores compatibles con la vida.
- **Cepa resistente:** Es una cepa de *MTB* que crece en concentración crítica establecida para una determinada droga antituberculosis.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

- **Cepa sensible:** Es una cepa de *MTB* que no crece en presencia de una concentración crítica de una droga antituberculosis.
- **Concentración crítica:** Es la cantidad precisa de cada droga antituberculosis que contiene el medio.
- **Contaminación:** Crecimiento de otros microorganismos en el medio de cultivo preparado para aislamiento de *MTB*.
- **Control de calidad:** Medidas internas y externas adoptadas para garantizar la calidad de los resultados de la prueba.
- **Criopreservación:** Es el proceso en el cual las unidades viables de la bacteria son congeladas a muy bajas temperaturas, generalmente a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para disminuir las funciones vitales del organismo y mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo.
- **Cultivo puro:** Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismo; los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo tengan la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos e identificarlos con seguridad.
- **Cultivo:** Aislamiento de una población de microorganismos procedentes de una sola célula viable, contiene sólo una especie o una cepa. En medios sólidos obtenemos colonias aisladas que provienen de una unidad formadora de colonias o células viables.
- **Estándar McFarland:** El patrón estándar de turbidimetría que se usa como una referencia para ajustar la turbidez de suspensiones bacterianas, de manera que el número de bacterias esté dentro de un rango estándar establecido.
- **Medicamentos antituberculosis:** Sustancias químicas con propiedades bactericidas o bacteriostáticas para complejo *MTB*.  
**Medicamentos antituberculosis de primera línea:** Medicamentos antituberculosis usados en el tratamiento de tuberculosis sensible.
- **Medicamentos antituberculosis de segunda línea:** Medicamentos antituberculosis usados en el tratamiento de tuberculosis multidrogo resistente.
- **Medio de cultivo:** Solución líquida o sólida estéril que contiene nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria.
- **Medio de Löwenstein-Jensen:** Medio de cultivo sólido con pH 6.8 a base de huevo, usado para el crecimiento de micobacterias.
- **Método de proporciones convencional:** Prueba de sensibilidad a drogas antituberculosis para determinar la proporción de mutantes resistentes en una población de bacterias.
- **Microcolonias:** Colonias muy pequeñas que son visualizadas a través de un estereoscopio.
- **Muestra biológica:** Cualquier material biológico de origen humano susceptible de conservación y que pueda albergar información sobre la dotación genética característica de una persona, que incluye: Sangre y sus derivados, tejidos u órganos y sus remanentes, obtenidos dentro de un procedimiento clínico.
- **Medio Ogawa:** Medio de cultivo con pH 6.2 - 6.4 a base de huevo, usado para el aislamiento de micobacterias.
- **Proporción crítica o criterio de resistencia:** Es la proporción de mutantes resistentes de una población de bacterias por encima de la cual la cepa es considerada resistente.
- **Prueba de sensibilidad:** Es la capacidad de la prueba para detectar la verdadera



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

sensibilidad o resistencia de la bacteria a los medicamentos antituberculosis.

- **Resistencia a los antimicrobianos:** Es la capacidad que tienen los microorganismos (como bacterias, virus y algunos parásitos) de impedir que los antimicrobianos (como antibióticos, antiviricos y antipalúdicos) actúen en contra de ellos. En consecuencia, debido a esto, los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otros.
- **Sensibilidad de la prueba de proporciones agar en placa:** Es la capacidad de la prueba para detectar a los verdaderos resistentes.
- **Tuberculosis:** Enfermedad infecciosa causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis* y se contagia de persona a persona a través de gotas microscópicas liberadas en el aire. En el 80 – 85% de los casos diagnosticados afecta a los pulmones; sin embargo, puede manifestarse en cualquier otro órgano ya que el bacilo tiene la capacidad de diseminarse por todo el organismo.
- **Tuberculosis multidrogo resistente:** Caso con resistencia simultánea a Isoniacida y Rifampicina por pruebas convencionales.
- **Tuberculosis extensamente resistente:** Caso con resistencia simultánea a Isoniacida, Rifampicina, una fluoroquinolona (Levofloxacin, Moxifloxacin) y un inyectable de segunda línea (Amikacina, kanamicina o Capreomicina) por prueba rápida molecular o convencional.
- **Tuberculosis sensible:** Tipo de tuberculosis cuyo patrón de sensibilidad no muestra resistencia a los medicamentos antituberculosis.
- **Velocidad de crecimiento:** Tiempo de crecimiento de las colonias.

## 6.2 SIGLAS

AC	:	Aseguramiento de la calidad,
Am	:	Amikacina.
ATCC	:	American Type Culture Collection.
BAAR	:	Bacilo Ácido Alcohol Resistente.
Bdq	:	Bedaquilina.
Cm	:	Capreomicina.
CC	:	Control de calidad.
CCI	:	Control de Calidad Interno.
Cfz	:	Clofazimina
CMTB	:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
CSB	:	Cabina de Seguridad Biológica.
DMSO	:	Dimetilsulfóxido.
EEC	:	Evaluación externa de calidad.
EESS	:	Establecimiento de Salud.
ESPCT	:	Estrategia Sanitaria de Prevención y Control de la Tuberculosis.
EPP	:	Equipo de protección personal.
FQN	:	Fluoroquinolona.
H	:	Isoniacida.
INS	:	Instituto Nacional de Salud.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

Lfx	:	Levofloxacin.
Lzd	:	Linezolid.
LJ	:	Löwenstein-Jensen.
LRNM	:	Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias.
LRR	:	Laboratorio de Referencia Regional.
MDR	:	Multidrogo resistente.
Mfx	:	Moxifloxacin.
MODS	:	Sensibilidad a Drogas Mediante Observación Microscópica.
NaLC	:	N-acetil L-cisteína.
NaOH	:	Hidróxido de Sodio.
NBS	:	Nivel de Bioseguridad.
OADC	:	ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa.
PANTA	:	Polimixina B, amfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim, azlocilina.
PBS	:	Solución Búfer Fosfato.
PS	:	Prueba de Sensibilidad.
Z	:	Pirazinamida.
QP	:	Químicamente puro.
R	:	Rifampicina.
UFC	:	Unidades formadoras de colonia.
VIH	:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

### 6.3 TRANSPORTE, RECEPCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

#### 6.3.1 Transporte de muestras:

El personal de la salud que está a cargo del transporte de las muestras debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Proteger la muestra del calor excesivo y la luz solar.
- Verificar el cierre hermético de la tapa de los envases (sellados con Parafilm), para evitar derrames o rupturas de los envases.
- Cada envío debe ser acompañado con el formato de solicitud de investigación bacteriológica, verificando que el número de muestras corresponda al número de solicitudes.
- Las muestras deben llegar al laboratorio acompañadas de su respectivo formato de solicitud de investigación bacteriológica, completamente llenado de acuerdo al Anexo N°1 de la NTS N° 104-MINSA/DGSP-V01 "Norma Técnica de Salud para la Atención Integral de las Personas Afectadas por Tuberculosis", aprobada con Resolución Ministerial N° 715-2013/MINSA, o la que haga sus veces. Además, se debe incluir el código de Registro Nacional de Instituciones Prestadoras de Servicio de Salud (RENIPRESS).
- El laboratorio que recibe la muestra revisa que las solicitudes de investigación bacteriológica estén completas y correctamente llenadas para su procesamiento.
- Cuando la identificación del/de la paciente que figura en la solicitud de investigación



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

bacteriológica no corresponde a la que figura en el envase, se debe coordinar con quien remite la muestra para resolver la discrepancia.

- Las muestras enviadas al laboratorio no deben contener ningún tipo de preservante (por ejemplo, formol); caso contrario, solicitar nueva muestra.
- Los envases de las muestras que se encuentren rotos deben ser descontaminados con hipoclorito de sodio al 1%, y descartarlos previa esterilización en autoclave.
- En el caso de muestras contaminadas o insuficientes (menos de 10 colonias), se informa al personal que remite la muestra para un nuevo envío de acuerdo al tipo de análisis.
- El transporte de muestras dentro del EESS desde la ESPCT al laboratorio, se realiza utilizando las cajas de acero inoxidable. Todas las ESPCT de los EESS del MINSA y de los Gobiernos Regionales deben contar con este material, el cual es proporcionado por las ESPCT de las DIRIS/DIRESAS/GERESAS (Figura 1).



Figura 1. Caja de acero inoxidable

Fuente: Imágenes propias del LRNM-INS

- En el caso de que se requiera transportar la muestra fuera del EESS al laboratorio de nivel local, regional y/o LRNM del INS, deben utilizarse contenedores herméticos de plástico resistentes, que incluyen porta-frascos con divisiones para colocar los envases (Figura 2). Para el transporte de muestras se debe contar con un servicio de movilidad que incluya el itinerario y cronograma para el recojo de las mismas en todos los EESS de su jurisdicción. Se debe considerar la NTS N° 153-MINSA/2019/INS: Norma Técnica de Salud sobre Preparación, Embalaje y Documentación para el Transporte Seguro de Sustancias Infecciosas, aprobada con Resolución Ministerial N° 463-2019/MINSA, o la que haga sus veces.

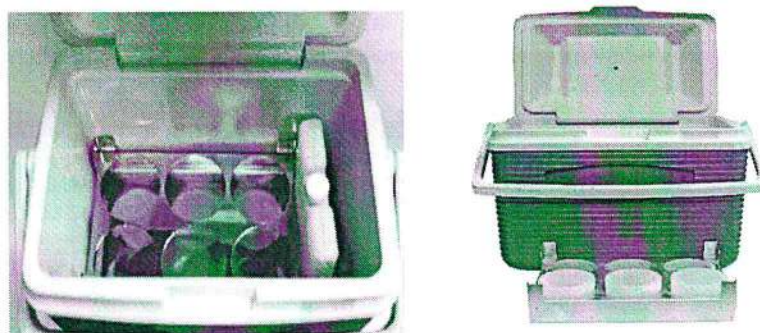


Figura 2. Disposición de muestras para su transporte fuera del EESS

Fuente: Imágenes propias del LRNM-INS



### 6.3.2 Recepción de muestras:

- La recepción de las muestras debe ser realizado por el personal de la salud que está encargado.
- La recepción de la muestra se realiza cumpliendo las medidas de bioseguridad que correspondan.
- Las muestras deben estar protegidas de la luz solar en el área destinada a la recepción de muestras.
- Verificar que las muestras estén bien rotuladas y coincidan con las solicitudes de investigación bacteriológica.
- Si existe un pequeño derrame del contenido, proceder a limpiar el envase con hipoclorito de sodio al 1% o el desinfectante de uso del laboratorio.
- Si el derrame es masivo en el paquete, se debe descontaminar y descartar la muestra previa esterilización en autoclave.<sup>1</sup>
- Evaluar el volumen y la calidad de las muestras.
- Notificar y hacer las recomendaciones al remitente sobre las deficiencias de los envíos, como identificación, calidad, volumen o la forma del envío del MTB<sup>2</sup>.

### 6.3.3 Conservación de muestras:

Las muestras en el laboratorio, si no son procesadas de inmediato, deben ser conservadas en refrigeración de 2 – 8 °C por el personal de laboratorio.

## 6.4 PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS EN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO CON INDICADOR DE CRECIMIENTO DE MICOBACTERIAS

### 6.4.1 Fundamento

El tubo con indicador de crecimiento contiene caldo Middlebrook 7H9 y una silicona, ubicada en su base. La silicona contiene un compuesto con fluorocromo unido al oxígeno. Cuando algún microorganismo, al respirar y multiplicarse, consume oxígeno, el fluorocromo se activa y la fluorescencia se evidencia con luz UV. Esta fluorescencia es una indicación del desarrollo del microorganismo. El inóculo del bacilo TB estandarizado para la PS es detectado generalmente en un periodo de 4 – 14 días después de la inoculación.<sup>5</sup>

La PS estandarizada es indirecta. El test está basado en la detección del crecimiento de los aislamientos del MTB en tubos que contienen droga en comparación con un tubo sin droga (tubo control). Si el bacilo es sensible, la droga inhibe el crecimiento y la fluorescencia en el tubo correspondiente. Por el contrario, si el bacilo es resistente se desarrolla en el tubo con droga y, por lo tanto, también va a haber fluorescencia. En ambos casos, el desarrollo del bacilo y la fluorescencia deben manifestarse en el tubo control.

Para reproducir el principio del método de las proporciones, el control es sembrado con un inóculo diluido 100 veces en relación con el que se siembra en los tubos con drogas (excepto para la Z). Si la fluorescencia en el tubo con una droga se acerca o supera a la del tubo control, se infiere que ha crecido más del 1% de clones resistentes y, entonces, el equipo clasifica al aislamiento del bacilo como resistente al fármaco en cuestión<sup>2,6,7</sup>



#### 6.4.2 Condiciones previas

- El laboratorio debe contar con equipos, tales como micropipetas, autoclave, incubadoras y CSB clase II Tipo A2, con programa de mantenimiento preventivo establecido.
- No utilizar los tubos con medio de cultivo ni los reactivos después de su fecha de caducidad.
- Se debe utilizar una punta (tip con filtro) de micropipeta estéril para cada muestra.
- Los tubos con medio líquido pueden conservarse a 2 – 35°C. NO CONGELAR. En el momento en que se va a realizar el análisis, los tubos con medio de cultivo, así como los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

#### A. Infraestructura y bioseguridad

El método de PS a drogas antituberculosis en medio de cultivo líquido con indicador de crecimiento requiere para su ejecución de un laboratorio con NBS III, se aplican medidas estrictas de bioseguridad y protección personal en todas las etapas del proceso, con equipos de contención primaria, elementos de protección personal, como uso de batas, gorro, cubre calzado, doble guantes (guantes de nitrilo y guantes de látex), respirador N95 y la ejecución de los procedimientos técnicos en forma correcta.

Asimismo, se tienen que aplicar medidas generales de bioseguridad, según el documento de bioseguridad del laboratorio (Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de Tuberculosis de la OMS).

- Todo procedimiento que incluya la manipulación de material infeccioso debe ser desarrollado dentro de la CSB.
- Todos los procedimientos deben ser realizados cuidadosamente con el objetivo de minimizar la producción de aerosoles.
- Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas diariamente, antes y después de terminar el trabajo, con alcohol al 70° o hipoclorito de sodio 1%. En caso ocurra el derrame de material infeccioso sobre las superficies de trabajo, estas deben ser descontaminadas inmediatamente, de acuerdo al procedimiento interno establecido en el laboratorio.
- Debe haber una autoclave in situ en las proximidades del laboratorio de contención para permitir la esterilización de tubos con cultivos de bacilos tuberculosos antes de retirarlas para su eliminación.
- Los/as analistas deben recibir entrenamiento en bioseguridad sobre los riesgos potenciales asociados al trabajo desarrollado del método.

#### B. Equipos, materiales y reactivos

Equipos del área de preparación de medios:

- Refrigeradora.
- Congeladora (-20°C).
- Balanza analítica.
- Agitador termomagnético.
- Baño maría con agitación.
- Agitador de tubo tipo Vórtex.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

- Autoclave.
- Jeringa dispensadora graduada de 10ml.
- Potenciómetro.
- Cabina de flujo laminar.

**Equipos de área de procesamiento de muestras (NBS III):**

- CSB Clase II, Tipo A 2.
- Incubadora con lector de indicador de fluorescencia.
- Agitador de tubo tipo Vórtex.
- Autoclave.
- Refrigeradora.
- Micropipeta de rango variable de 20µl a 200µl
- Micropipeta de rango variable de 100ul a 1000ul.
- Incubadora.
- Densitómetro.
- Computadora (con software para realizar la lectura de los tubos con indicador de crecimiento).

**Materiales:**

- Pipetas serológicas de 1ml y 10ml.
- Propipetas de jebe.
- Pipetas de transferencia de polipropileno estériles empaque individual de 3ml.
- Matraz Erlenmeyer de 2L.
- Beaker de 1L.
- Probeta graduada de 100ml y 250ml.
- Probeta graduada de 500ml.
- Criovialestéril de 2.0ml.
- Micro Espátula de acero inoxidable.
- Tubos de vidrio de 16 X 100mm con tapa rosca estéril.
- Tubos de centrifuga estériles de polipropileno de 15ml.
- Gradillas (soportes) de polipropileno para tubos de 16 x 100mm.
- Tips con filtro de 100 a 1000µl con filtro.
- Tips con filtro de 10 a 200µl con filtro.
- Porta tubos.
- Agua destilada estéril.
- Plumones marcadores.
- Bolsa de bioseguridad autoclavable.
- Guantes de látex o nitrilo.
- Papel absorbente plastificado.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

- Alcohol 70°.
- Gasa.
- Caja de acero inoxidable.
- Desinfectante de uso en el laboratorio (hipoclorito de sodio 1%).

**Reactivos:**

- Tubo con indicador de crecimiento de Micobacterias de 7ml.
- Tubo con indicador de crecimiento de Micobacterias de 7 ml modificado para Z.
- Antibióticos liofilizados de R y H.
- Suplemento de crecimiento OADC.
- Enriquecedor ADC (albúmina-dextrosa-catalasa).
- Antibiótico liofilizado de Z.
- Suplemento de crecimiento de Z.
- Am Q.P. x 332ug.
- Cm Sulfato Q.P. x 830ug.
- Mfx Q.P. x 498ug.
- Lfx Q.P.
- Bdq Q.P.
- Cfz Q.P.
- Lzd Q.P.
- Caldo base Middlebrook 7H9.
- Solución Salina estéril.
- Estándar Mc Farland 0.5 y 1.0.

**C. Condiciones de la muestra**

- Cultivo puro de MTB en medio de cultivo sólido de 30 a 45 días de crecimiento, contadas a partir de la siembra y que tenga más de 10 colonias.
- Cultivo líquido en fase de crecimiento logarítmico, según se detalla en la **preparación del inóculo a partir de un cultivo líquido con indicador de crecimiento de Micobacterias** del sub literal a), del literal B del apartado 6.4.3.
- Cultivo sólido o líquido que presente un resultado de resistencia a H y/o R.
- Las cepas se ordenan cronológicamente de acuerdo a su llegada y se conservan dentro del laboratorio a la temperatura ambiente.

**6.4.3 Procedimiento**

**A. Etapa pre analítica**

**a) Preparación de medio con droga**

Trabajar en cabina de flujo laminar o de CSB Clase II, Tipo A 2.

- Reconstituir los frascos con los antibióticos liofilizados, añadiendo agua destilada estéril (ver Tabla N° 1) para preparar una solución stock, mezclar



**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

vigorosamente y verificar que las drogas estén completamente disueltas.

- Rotular y alicuotar 0.2 – 0.5ml de las drogas reconstituidas en crioviales. Si se realizan PS ese día, separar una alícuota de cada droga y congelar el resto a -20°C hasta por 6 meses.
- Rotular los tubos con indicador de crecimiento de 7ml para cada PS considerando un tubo como C (control de crecimiento), y tubos con indicador de crecimiento para cada una de las drogas a ensayar (excepto Z).
- Empleando una micropipeta, agregar aseptícamente 0,8ml de suplemento de crecimiento OADC a cada tubo del grupo control y los tubos rotulados con las drogas a ensayar.
- Empleando una micropipeta, agregar 100µl de droga reconstituida a los tubos con indicador de crecimiento. Es importante agregar el antibiótico apropiado al tubo correspondiente.
- Descartar cualquier remanente de droga reconstituida que no se vaya a usar en ese momento.

**Tabla N° 1: Concentraciones de drogas**

DROGA	Antibiótico liofilizado (µg)	Reconstituir con agua destilada estéril (ml)	SOLUCIÓN STOCK (µg/ml)	CONCENTRACIÓN FINAL en el tubo con indicador de crecimiento de Micobacterias (µg /ml)
H	33,2	4.0	8.3	0.1
R	332	4.0	83	1.0
R	332	8.0	41.5	0.5
Am	332	4.0	83	1.0
Cm	830	4.0	207.5	2.5
Mfx	498	6.0	83	1.0



Para la droga Lfx, Bdq, Cfz y Lzd QP que no vienen liofilizadas, es necesario conocer la potencia de la droga, que puede variar de un fabricante a otro y de un lote a otro. La potencia puede ser declarada directamente por el/la fabricante o puede ser calculada a partir de los datos también declarados por el/la fabricante: 1) Pureza de la droga, 2) contenido de agua, 3) proporción de antibiótico que contiene la molécula de la droga (fracción activa). De contar con antibióticos con pureza > a 99%, la potencia es prácticamente 100% o 100µg/mg. (Ver Anexo 18)

Pero si son necesarios los ajustes con otras drogas, como Bdq fumarato, los aminoglucósidos, la capreomicina, FQN, pueden adquirirse en forma de sal y a veces, con cierto contenido de agua y/o impurezas.

Conocida la potencia, se calcula la cantidad de droga que debe ser pesada para preparar la solución madre utilizando la siguiente fórmula:

**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{volumen solución madre (ml)} \times \text{concentración solución madre (\mu\text{g/ml})}}{\text{Potencia}}$$

Entonces para 10 ml de solución madre, a una concentración de 10000 $\mu\text{g/ml}$  y una potencia de 1000 $\mu\text{g/mg}$ :

$$\text{Peso (mg)} = \frac{10\text{ml} \times 10000\mu\text{g/ml}}{1000\mu\text{g/mg}} = 100\text{mg}$$

- Pesar la droga y como diluyente se usa agua destilada estéril o DMSO dependiendo de la droga (ver Tabla N° 2), en caso de usar agua destilada esterilizar por filtración con filtro de policarbonato para minimizar la pérdida, y, si es de otro tipo, desechar el primer 10-15% de las soluciones filtradas, y recoger la solución restante para su uso.
- Rotular y alicuotar 100 $\mu\text{l}$  de la solución madre en crioviales. Si se realizan PS ese día, separar una alicuota de la droga y congelar el resto a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta por 6 meses.
- Proceder de la solución madre a hacer diluciones (ver Tabla N° 2).
- Empleando una micropipeta, agregar 100 $\mu\text{l}$  de la solución de trabajo B de la droga al tubo con indicador de crecimiento rotulado con el nombre de la droga respectiva.
- Descartar cualquier remanente de droga reconstituida que no se vaya a usar en ese momento.

**Tabla N° 2: Concentraciones de Lfx, Bdq, Cfz, Lzd**

Droga	Diluyente ml (para todas las diluciones)	Concentración de la solución madre ( $\mu\text{g/ml}$ )	N° de crioviales alicuotados a 100 $\mu\text{l}$	Sol. De trabajo A 1/10 [1 000 $\mu\text{g/ml}$ ]	Sol. de trabajo Dilución B ( $\mu\text{l}$ de la dilución A + $\mu\text{l}$ de H <sub>2</sub> O ó DMSO*) para 1000 $\mu\text{l}$	Concentración final $\mu\text{g/ml}$	Concentración final en el tubo indicador de crecimiento ( $\mu\text{g/ml}$ )
Lfx	2ml*	10 000	19	100 $\mu\text{l}/900\mu\text{l}$	83 $\mu\text{l}$ + 917 $\mu\text{l}$	83	1.0
Bdq	2ml**	10 000	19	100 $\mu\text{l}/900\mu\text{l}$	83 $\mu\text{l}$ + 917 $\mu\text{l}$	83	1.0
Cfz	2ml**	10 000	19	100 $\mu\text{l}/900\mu\text{l}$	83 $\mu\text{l}$ + 917 $\mu\text{l}$	83	1.0
Lzd	2ml*	10 000	19	100 $\mu\text{l}/900\mu\text{l}$	83 $\mu\text{l}$ + 917 $\mu\text{l}$	83	1.0

\*Agua destilada estéril \*\*DMSO

**b) Preparación de medio con droga Pirazinamida**

- Reconstituir con 2.5 ml de agua destilada estéril (ver Tabla N° 3) al frasco con droga (solución stock Z). Mezclar vigorosamente y verificar que la droga esté completamente disuelta.
- Rotular y alicuotar 0.2 – 0.5ml de la droga Z reconstituida en crioviales. Si se



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

realizan PS ese día, separar una alícuota y congelar el resto a -20°C hasta por 6 meses.

- Rotular 2 tubos de medio con indicador de crecimiento modificado para Z, para cada PS: Uno como C para control de crecimiento (sin droga) y uno como Z; colocarlos en la secuencia correcta en el carrier.
- Con una micropipeta, adicionar 0.8ml de suplemento de crecimiento de Z en cada tubo con indicador de crecimiento modificado para Z.
- Con una micropipeta, agregar 100µl de la droga reconstituida de Z al tubo rotulado con Z.
- Descartar cualquier remanente de droga reconstituida que no se vaya a usar en ese momento.

Tabla N° 3: Concentraciones de Z

DROGA	Antibiótico liofilizado (µg)	Reconstituir con agua destilada estéril (ml)	Solución Stock (ug/ml)	Concentración final en el tubo con indicador de crecimiento para Z (µg/ml)
Z	20 000	2.5	8000	100

## B. Etapa analítica

### a) Preparación del inóculo bacteriano para la prueba de sensibilidad

El inóculo puede prepararse a partir de un cultivo positivo en medio líquido de un tubo con indicador de crecimiento y de cultivos en medio sólido puros de MTB confirmados mediante técnicas de identificación (test inmunocromatográfico).

#### Preparación del inóculo a partir de un cultivo líquido con indicador de crecimiento de micobacterias de 7ml positivo

- El primer día en que el equipo detecta un resultado de cultivo positivo para un tubo con indicador de crecimiento se considera el día 0 y el tubo es incubado a 37°C un día más (día 1) antes de ser utilizado para la PS.
- Un tubo positivo puede ser utilizado para probar la sensibilidad al fármaco hasta el quinto día después que la incubadora con lector de fluorescencia lo reporta como positivo. Un tubo positivo con más de 5 días de antigüedad, se subcultiva en un nuevo tubo con indicador de crecimiento de 7ml con suplemento para crecimiento e incubado en la incubadora con lector de fluorescencia hasta que muestre positividad y pueda ser usado de 1 a 5 días después de mostrar positividad.
- Para un tubo con una positividad de 1 ó 2 días, utilizar el caldo de suspensión del tubo con indicador de crecimiento para el proceso de inoculación. Mezclar bien. Continuar con la inoculación para las PS.
- Para tubos con una positividad de 3, 4 ó 5 días, mezclar bien y diluir 1ml del caldo positivo en un tubo con 4ml de agua destilada estéril (dilución de 1:5). Mezclar bien el tubo. Utilizar la suspensión diluida para la inoculación para las PS.

**Nota:** Es importante preparar el inóculo utilizando las referencias de tiempo descritas para obtener la concentración apropiada del microorganismo para



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

el análisis de sensibilidad.

#### Preparación del inóculo a partir de medios sólidos

- Con una espátula de siembra, tomar el mayor número posible de colonias de un cultivo de 30 a 45 días como máximo, procurando evitar coleccionar medio sólido y poner en suspensión las colonias en 4ml de agua destilada estéril o en caldo Middlebrook 7H9.
- Agitar la suspensión en el agitador de tubos durante 15 segundos para disgregar los grumos más grandes. La turbidez de la suspensión debe superar el patrón 1.0 de Mc Farland.
- Dejar que la suspensión repose durante 20 minutos.
- Utilizando una pipeta serológica de 1 ml o una pipeta de transferencia estéril de 3 ml colocar el sobrenadante a un tubo con agua destilada estéril o solución salina y estandarizar la suspensión bacteriana a escala patrón Mc Farland 0.5.
- Diluir 1ml de la suspensión ajustada en 4ml de agua destilada estéril o solución salina (dilución de 1:5). Continuar con el proceso de inoculación para las PS.
- Guardar las cepas originales en la estufa de 37°C hasta la liberación de los resultados.

**Nota:** Algunos laboratorios de referencia de Latinoamérica han experimentado que el empleo del patrón de turbidez Mc Farland 1 es más adecuado para reducir la frecuencia de resultados inválidos, por escaso desarrollo en el tubo control.

#### b) Inoculación para prueba de sensibilidad

##### Inoculación para la prueba de sensibilidad a partir de cultivo sólido

- Codificar los tubos controles con indicador de crecimiento de micobacterias de 7ml para cada cepa analizada con el código asignado a cada prueba.
- Colocar los tubos con la secuencia correcta para el test de susceptibilidad.
- Con una micropipeta, transferir 500ul de la dilución 1:5 (Ver preparación del inóculo a partir de medios sólidos del sub literal a) del literal B del apartado 6.4.3) a un tubo con agua destilada estéril o solución salina de 4.5ml, siendo esta la dilución 1:10.
- A partir de la dilución 1:10, transferir 500ul a un tubo con agua destilada estéril o solución salina de 4.5ml, siendo esta la dilución 1:100.
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión 1:100 en el tubo sin droga (Tubo Control "C").
- Con una micropipeta inocular 500ul de la suspensión 1:5 en cada uno de los tubos conteniendo las drogas.
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos por inversión suavemente entre 3 y 4 veces.

##### Inoculación para el análisis de sensibilidad a partir de un cultivo líquido con indicador de crecimiento de micobacterias positivo

- Codificar los tubos controles con indicador de crecimiento de 7ml para cada cepa analizada con el código asignado a cada prueba.
- Colocar los tubos en la secuencia correcta para el test de susceptibilidad.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

**Aislamiento en medio de cultivo líquido con indicador de crecimiento del día 2:**

- Con una micropipeta, transferir 500ul del tubo con el indicador de crecimiento positivo a un tubo con 4.5ml de agua destilada estéril o solución salina (dilución 1:10).
- A partir de la dilución 1:10, transferir 500ul a un tubo con 4.5ml de agua destilada estéril o solución salina (dilución 1:100).
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión 1:100 en el tubo sin droga (Tubo Control "C").
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión del tubo con indicador de crecimiento positivo en cada uno de los tubos conteniendo las drogas.

**Aislamiento en medio líquido con indicador de crecimiento del día 3, 4 ó 5:**

- Con una micropipeta, transferir 1ml del tubo con indicador de crecimiento positivo en 4ml de agua destilada estéril o solución salina (dilución 1:5).
- Con una micropipeta, transferir 500ul de la dilución 1:5 a un tubo con agua destilada o solución salina de 4.5ml, siendo esta la dilución 1:10.
- A partir de la dilución 1:10, transferir 500ul a un tubo con agua destilada o solución salina de 4.5ml, siendo esta la dilución 1:100.
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión 1:100 en el tubo sin droga (tubo Control "C").
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión 1:5 en cada uno de los tubos conteniendo las drogas.
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos de inversión suavemente entre 3 y 4 veces.

**c) Inoculación para la prueba de sensibilidad de Pirazinamida.**

**Inoculación para el análisis de sensibilidad a partir de cultivo sólido:**

- Codificar los tubos controles Z de 7ml para cada cepa analizada.
- Colocar los tubos en la secuencia correcta para el test de susceptibilidad.
- Con una micropipeta, transferir 500ul de la dilución 1:5 (Ver preparación del inóculo a partir de medios sólidos del sub literal a), del literal B del apartado 6.4.3.) a un tubo con agua destilada o solución salina de 4.5ml, siendo la dilución 1:10.
- Con micropipeta, inocular 500ul de la suspensión 1:10 en el tubo Z sin droga (Tubo Control "C").
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión 1:5 en el tubo con droga Z.
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos de inversión suavemente entre 3 y 4 veces.

**Inoculación para el análisis de sensibilidad a partir de cultivo en medio líquido con indicador de crecimiento positivo:**

- Codificar el tubo control Z de 7ml para cada cepa analizada.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

- Colocar los tubos en la secuencia correcta para el test de susceptibilidad.

**Aislamiento en medio de cultivo líquido con indicador de crecimiento del día 2:**




- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión del tubo positivo a un tubo con 4.5ml de agua destilada estéril o solución salina (dilución 1:10).
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la dilución 1:10 en el tubo Z sin droga (Tubo Control "C").
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la suspensión del tubo positivo en el tubo con droga Z.
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos de inversión suavemente entre 3 y 4 veces.

**Aislamiento medio líquido con indicador de crecimiento del día 3, 4 ó 5:**

- Con una micropipeta, transferir 1ml del tubo positivo en 4ml de agua destilada estéril o solución salina (dilución de 1:5).
- Con una micropipeta, transferir 500ul de la dilución 1:5 a un tubo con agua destilada o solución salina de 4.5ml, siendo la dilución 1:10.
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la dilución 1:10 en el tubo Z sin droga (tubo control).
- Con una micropipeta, inocular 500ul de la dilución 1:5 en el tubo con droga Z.
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos de inversión suavemente entre 3 y 4 veces.

**d) Ingreso del set de sensibilidad a la incubadora con lector de fluorescencia:**

**Incubación:**

- Colocar todos los tubos procesados en los carrier con el número de espacios a utilizar; ordenando de izquierda a derecha, empezando por el tubo C seguido de cada una de las drogas de primera y segunda línea sin incluir Z.
- Abrir uno de los compartimientos de la incubadora y presionar el botón de entrada  , se ilumina el lector de código de barras, y escanear el código de barras del carrier.
- Verificar que las drogas y concentraciones indicadas en la pantalla sean las correctas. Caso contrario, apretar el botón  y buscar la droga y concentración adecuada, pulsando  del lado derecho de la pantalla y apretar la tecla OK.
- Ubicar el carrier en cada estación iluminada dentro del compartimento.
- Cerrar el compartimento.
- Repetir el mismo procedimiento para Z, con su propio tubo control.

**C. Etapa post analítica**

**a) En el software para realizar la lectura de los tubos con indicador de crecimiento.**

- Seleccionar el cuarto ícono (instrumentos del sistema) de la barra de




DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

herramientas, aparece una mini pantalla con los 3 compartimentos.

- Seleccionar el compartimento que corresponda y aparece una pantalla con todas las pruebas que se encuentran en la incubadora.
- Posicionarse en la prueba y retirar.
- En seguida, salen los resultados de sensibilidad; estos deben ser colocados en la hoja de trabajo del laboratorio. Escribir S si es sensible y R si es resistente. Finalmente, con los datos obtenidos se analizan las curvas de crecimiento del test de sensibilidad.

**b) En la Incubadora con lector de fluorescencia.**

- Verificar diariamente la indicación de resultados finalizados en la incubadora.
- La indicación puede ser positiva (signo positivo, luz roja) o error (signo de exclamación, luz amarilla).
- El compartimento que muestre alguna señal debe ser abierto. En ese momento, aparecen en la pantalla los íconos indicativos de las actividades a realizar.
- Presionar el ícono: 
- Retirar el tubo cuya estación estuviera iluminada, escanear su código de barras en el lector para liberarlo.
- Cerrar el compartimento.

**c) Interpretación de resultados**

- Comparar visualmente los resultados que se evidencian en los tubos con indicador de crecimiento con los resultados reportados desde el software en la hoja de trabajo del laboratorio. Considerar el siguiente criterio:
  - Si el tubo control presenta flóculos o grumos y los tubos con droga son transparentes, validar el resultado de sensible.
  - Si el tubo control y el tubo con droga presentan flóculos o grumos típicos de *MTB*, validar el resultado de resistente.
  - Si algún tubo está turbio, sin flóculos o grumos, se sospecha contaminación. Se recomienda hacer un frotis. Si se observa flora no ácido alcohol resistente, anular la prueba y repetirla a partir del aislamiento puro. Si se observan BAAR, disponer que se verifique si el cultivo contiene una micobacteria ambiental; en este caso, invalidar la prueba.
  - Repetir las pruebas que indiquen que en los tubos con droga el crecimiento se aproxima o mantiene cerca pero no supera las 100 UC y los tubos control no superan las 400 UC (resultado *borderline* o dudoso). Esto se realiza a partir del cultivo positivo original.
  - Ingresar los resultados finales en el sistema NetLabV2 para su respectiva validación y liberación.



**Pruebas con los siguientes mensajes**

- Prueba inválida: Ocurre después de 14 días, cuando no hay crecimiento en el tubo control. Liberar el resultado como "no desarrollo". Tomar la cepa original y realizar un subcultivo en tubo con indicador de crecimiento para micobacterias de 7 ml; incubar dentro de la incubadora con lector de fluorescencia como tubo

**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

independiente para intentar recuperarla. Después de la incubación, si hubiera crecimiento, repetir la prueba.

- Cuando se libera el segundo resultado, colocar la observación que la cepa fue recuperada.
- Umbral positivo / prueba invalida: Crecimiento rápido; significa exceso de inóculo o MNT (Micobacteria no tuberculosa) de crecimiento rápido o contaminación. Hacer un frotis del tubo control. Si se observa flora no ácido alcohol resistente, repetir la prueba a partir del aislamiento puro. Si se observan bacilos ácido alcohol resistente, proceder con la identificación de la micobacteria.

#### **6.4.4 Control de Calidad**

##### **A. Control de calidad interno**

###### **a) Control de esterilidad de los medios y soluciones preparados**

###### **Caldo Middlebrook 7H9**

- Verificar que el caldo sea transparente, ligeramente amarillo.
- Seleccionar al azar 5 tubos de cada lote de medio recién preparado e incubar de 36° a 37°C, entre 48 a 72 horas.
- Verificar que los caldos incubados se mantengan transparentes.
- Si presentan turbidez, indica contaminación; por lo que, se descarta todo el lote.

###### **Solución Salina Polisorbato**

- Verificar que la solución sea transparente e incolora.
- Seleccionar al azar 5 tubos de cada lote de medio recién preparado e incubar a 36 a 37°C, entre 48 a 72 horas.
- Verificar que la solución salina, luego de la incubación, se mantenga transparente; si se observa turbia, indica contaminación y se procede a descartar todo el lote.

###### **b) Manejo de cepas de referencia**

Cada vez que se empiece a utilizar un lote nuevo de drogas y un lote nuevo de tubos con indicador de crecimiento es necesario probar su desempeño con el uso de cepas de referencia siguiendo todos los pasos anteriores para la PS a drogas antituberculosis en medio de cultivo líquido con indicador de crecimiento de micobacterias.

###### **Cepas de referencia comercial:**

- Cepa MTB H37Rv N° 27294 TMC N° 102.
- Cepa MTB H37RV resist. a H N° 35822 TMC N° 303.
- Cepa MTB H37RV resist. a R N° 35838 TMC N° 331.

##### **B. Control de calidad externo**

Se trata de un sistema de evaluación retrospectiva y objetiva de resultados de distintos laboratorios mediante programas organizados por un laboratorio de



**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

referencia, denominado programa de evaluación externa del desempeño (PEED). El objetivo principal es comparar los resultados entre laboratorios, de acuerdo con una norma de referencia. Se denomina también prueba de competencia interlaboratoriales.

El CC externo se realiza con cepas que tienen patrón de resistencia conocido, enviadas por el LRNM o el que haga sus veces del INS a los laboratorios que realizan PS. Estas cepas son distribuidas en medios de cultivo LJ a los profesionales para su respectivo proceso y reporte de los resultados.

Los resultados que se obtienen son enviados al LRNM o el que haga sus veces del INS para la evaluación de la concordancia.

## **6.5 Sensibilidad a Drogas Mediante Observación Microscópica (MODS)**

### **6.5.1 Fundamento**

El método se basa en la observación de cordones característicos de MTB cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio de luz invertido. El método ha sido diseñado para la detección del crecimiento de la bacteria y la sensibilidad a H y R.

### **6.5.2 Condiciones previas**

El laboratorio debe contar con todos los equipos requeridos para la ejecución del método en buen funcionamiento.

#### **A. Infraestructura y bioseguridad**

La prueba MODS requiere para su ejecución de un laboratorio con NBS II y III; se aplican medidas estrictas de bioseguridad y protección personal en todas las etapas del proceso, con equipos de contención primaria, elementos de protección personal, como uso de batas, gorro, cubre calzado, doble guantes (guantes de nitrilo y guantes de látex), respirador N95 y la ejecución de los procedimientos técnicos en forma correcta.

Asimismo, se tienen que aplicar medidas generales de bioseguridad, según Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de Tuberculosis de la OMS.<sup>2</sup>

- Todos los procedimientos que incluyen la manipulación de materiales infecciosos deben ser desarrollados dentro de la CSB.
- Las ventanas y puertas del laboratorio han de permanecer siempre cerradas y la cabina debe de instalarse sobre una superficie sólida, nunca móvil.
- Todos los procedimientos deben ser realizados cuidadosamente con el objetivo de minimizar la producción de aerosoles.
- Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas diariamente, antes y después de terminar el trabajo, con alcohol 70° o hipoclorito de sodio 1%. En caso ocurra el derrame de material infeccioso sobre las superficies de trabajo, deben ser descontaminadas inmediatamente, de acuerdo al procedimiento interno.
- Todos los residuos sólidos peligrosos deben ser descontaminados antes de ser descartados.
- Los/as analistas deben recibir entrenamiento en bioseguridad sobre los riesgos potenciales asociados al trabajo desarrollado del método.



## B. Equipos, materiales y reactivos

### Equipos:

- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Potenciómetro (medidor de pH).
- Hot plate con barras de agitación magnéticas.
- Refrigeradora.
- Congeladora (-20°C o -70°C).
- Micropipetas (1000µl, 200µl, 100µl y 20µl).
- Micropipeta multicanal 100µl.
- Microscopio de luz invertido (objetivos 4x y 10x).
- CSB clase II, tipo A2.
- Estufa incubadora 36°C - 37 °C.
- Computadora con scanner (opcional).
- Agitador de tubos tipo Vórtex.
- Densitómetro (o escala Mc Farland 1.0).
- Centrífuga refrigerada.

### Materiales:

- Tubos de vidrio con tapa rosca de 16 x 100mm.
- Cronómetro.
- Tubo de centrifuga de polipropileno con tapa rosca, fondo cónico graduado x 15ml (estéril).
- Tubo de centrifuga de polipropileno con tapa rosca, fondo cónico x 50ml (estéril).
- Pipetas serológicas de 10ml.
- Pipetas de transferencia estériles de 3ml.
- Tips estériles de 20µl, 200µl, 1000µl con y sin filtro.
- Microplacas de polipropileno de 24 pozos de fondo plano con tapa.
- Bolsas de polietileno de cierre hermético.
- Filtros para jeringa de 0.2µm (para solventes acuosos).
- Filtros para jeringa de 0.2µm (para solventes orgánicos).
- Probeta graduada de 1000ml, 500ml, 250ml y 50ml.
- Matraz Erlenmeyer de 1000ml y 2000ml.
- Frascos de vidrio resistente a altas temperaturas de 100ml, 250ml, 500ml y 1000ml.
- Propipeta de jebe.
- Gradillas para tubos de 16 x 100mm.
- Gradillas para tubos de centrifuga de 50ml.
- Crioviales estériles de 2ml.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

- Plumón indeleble.
- Cinta indicadora de esterilización para autoclave.
- Cinta indicadora de esterilización para horno.
- Parafilm.
- Papel aluminio.
- Papel glassine.
- Micro espátulas de acero inoxidable.
- Jeringas 10ml estériles descartables.
- Barra magnética.
- Papel absorbente plastificado.
- Silicagel absorbente de humedad.
- Criobox.

**Reactivos:**

- Caldo Middlebrook 7H9.
- Casitona (caseína pancreática digestiva).
- Mezcla liofilizada de agentes microbianos MGIT PANTA (suplemento antimicrobiano).
- Medio Middlebrook OADC (ácido oleico–albúmina–dextrosa–catalasa).
- Medio Middlebrook ADC (albúmina–dextrosa–catalasa)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Hidróxido de sodio en lentejas (NaOH)
- Citrato de sodio tribásico, dihidratado
- NaLC.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).
- Fosfato de potasio monobásico en cristales (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).
- Hipoclorito de sodio.
- Glicerol 99,5% QP.
- Agua destilada estéril.
- 70% v/v etanol.
- Polisorbato 80.
- H.
- R.

**C. Condiciones de la muestra**

**Tipo de muestra**

- La prueba se realiza a partir de muestras de esputo y extrapulmonares (líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, aspirado gástrico) de pacientes con diagnóstico de TB pulmonar con baciloscopía positiva o negativa que aún no hayan iniciado tratamiento (pacientes nunca tratados), pacientes antes tratados (recaídas,



**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

abandonos recuperados) y con tratamiento.

- La cantidad de muestra extrapulmonar y de esputo requerida es 2 a 5ml con tiempo de recolección no mayor a 72 horas.
- Si la muestra no se procesa el mismo día de la recolección, debe ser conservada en refrigeración de 2°C a 8°C. Es recomendable procesar la muestra dentro de las 72 horas de haber sido recolectada.

### **6.5.3 Procedimiento**

#### **A. Etapa pre-analítica**

##### **a) Preparación del medio de cultivo 7H9 con OADC y PANTA**

- Disponer de tubos con 4.5ml de caldo 7H9: Un tubo para cada muestra de esputo, 3 tubos para las 3 cepas controles y un tubo para control negativo por cada placa.
- Disponer de un tubo con 10.8ml de caldo 7H9 para realizar la dilución de antibióticos.
- Adicionar 0.5ml de OADC a cada tubo conteniendo 4.5ml de caldo 7H9 (7H9-OADC), que son utilizados para trabajar las muestras, los controles negativos y controles positivos.
- Añadir 1.2ml de OADC al tubo conteniendo 10.8ml de caldo 7H9 (7H9-OADC), para la dilución de antibióticos.
- Reconstituir el PANTA con 3ml de agua destilada estéril y añadir 0.1ml a cada tubo designado para la muestra y a los tubos designados como controles negativos.
- Separar 3 tubos con 5ml de 7H9-OADC para los controles positivos y el tubo con 12ml de 7H9-OADC para realizar la dilución de antibióticos (No requieren PANTA).

#### **Dilución de drogas**

La dilución de drogas (H y R) se realiza en placas de 24 pocillos de fondo plano. El día que se va a realizar la siembra de las muestras, las placas deben ser rotuladas con los códigos de las muestras y fecha del proceso.

- Retirar de la congeladora la solución stock de los antibióticos (8 mg/ml) y dejar descongelar a temperatura ambiente dentro de la cabina (Ver Anexo 7).
- Dispensar 1ml del caldo 7H9+OADC a los pozos C y D de la primera columna de la microplaca.
- Dispensar 2ml del caldo 7H9+OADC a los 4 pozos de la segunda columna de la microplaca.
- Empleando una micropipeta, retirar 5µl de medio del pozo "C" de la primera columna y añadir 5 µL de la solución stock de H. Mezclar bien (0.04 mg/ml= 40 µg/ml H dilución 1).
- Empleando una micropipeta, retirar del pozo "D" de la primera columna 12.5µl de medio y añadir 12.5µl de la solución stock de R; mezclar bien (0.1 mg/ml =100 µg/ml R dilución1).
- Dispensar 2ml de caldo 7H9+OADC a los 4 pozos A, B, C, y D de la columna 2 de la microplaca.



### Solución de trabajo de las drogas

- Empleando una micropipeta, retirar 200µl de los pozos "C" y "D" de la segunda columna.
- Adicionar 200µl de la dilución 1 de H al pozo "C" de la segunda columna de la microplaca; mezclar bien (4 µg/ml H solución de trabajo).
- Añadir 200µl de la dilución 1 de R al pozo "D" de la segunda columna de la microplaca; mezclar bien (10 µg/ml R solución de trabajo).
- Empleando una micropipeta multicanal cargar 100µl de la solución de trabajo de los pozos A, B, C, y D de la segunda columna y dispensar a los pozos A, B, C, y D de una nueva placa destinada para las muestras y control negativo (el control negativo va en la tercera columna).
- Empleando una micropipeta multicanal cargar 100µl de la solución de trabajo de los pozos A, B, C, y D de la segunda columna y dispensar a los pozos A, B, C, y D de la cuarta, quinta y sexta columna de la placa destinada para los controles positivos.

### b) Preparación de soluciones para la descontaminación de la muestra

- Pesar la cantidad necesaria de NALC que se va a añadir a la solución NaOH - Citrato de sodio. (Anexo 6)
- Adicionar el NALC a la solución de NaOH-citrato de sodio y mezclar suavemente.
- Cada 2ml de muestra de esputo requiere 2ml de solución NaOH-Citrato de sodio.
- Utilizar la solución descontaminante sólo en el día que fue preparado.

### B. Etapa analítica

Limpiar la CSB con el desinfectante, delimitar el área contaminada colocando el papel absorbente sobre la mesa de trabajo, desinfectar todos los materiales que se usan en el proceso de la prueba con una gasa o paño embebido en alcohol al 70% antes de ingresarlos a la CSB.

### a) Procedimiento de descontaminación

- Colocar dentro de la CSB una cubeta de descarte con hipoclorito de sodio al 1%, fenol al 5% u otro desinfectante recomendado para descartar el material contaminado.
- Colocar con una pipeta de transferencia, 2ml de esputo en un tubo de polipropileno de centrifuga de 15ml o 50ml.
- Añadir 2ml de la solución NaOH-NALC a una proporción (1:1).
- Asegurar bien la tapa y mezclar con el agitador de tubos tipo vortex por 20 segundos.
- Dejar reposar dentro de CSB por un mínimo de 15 minutos. Puede prolongarse a 20 minutos más si la muestra es demasiado mucosoide.
- Adicionar buffer fosfato (pH 6.8), para neutralizar la reacción alcalina y terminar con el proceso de descontaminación, mezclar bien invirtiendo el tubo por 4 veces.
- Centrifugar a 3000 g por 15 minutos.



**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

- Descartar cuidadosamente el sobrenadante en un recipiente que contenga ortofenilfenol y amilfenol terciario 0.8%, hipoclorito de sodio 1 % o fenol al 5% y mantener el sedimento de la muestra.

**b) Siembra en placas y en medio Löwenstein - Jensen**

- Resuspender el sedimento de la muestra con 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (5.1ml).
- Homogenizar bien la suspensión evitando formar burbujas de aire.
- De esta suspensión de la muestra, extraer 1ml y adicionar al tubo conteniendo el restante del medio 7H9-OADC-PANTA; mezclar bien. Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa.
- De la suspensión restante. realizar la siembra en 2 tubos con medio LJ a razón de 0.2ml por tubo y el resto conservar en criovial de 2°C - 8°C como muestra de contingencia.
- Los tubos que contienen PANTA (7H9-OADC-PANTA) se emplean para las muestras y para los controles negativos.
- Se emplea 7H9-OADC sin PANTA para los controles positivos.
- Dispensar 900µl de la suspensión final de la muestra a cada uno de los 4 pozos de la placa de 24 pozos. Cada columna corresponde a una muestra.
- Dispensar 900µl del medio 7H9-OADC-PANTA sin muestra en los 4 pozos de la columna 3 de cada placa de MODS (controles internos negativos).
- Cerrar la placa, colocar en una bolsa de polietileno de cierre hermético (la bolsa no se debe abrir de ahora en adelante).
- Incubar a 37°C entre 5 a 21 días.

**c) Preparación de las cepas control positivo – Control de calidad interno.**

- Cada vez que se procesan muestras, se deben incluir 3 cepas: Control positivo sensible, control positivo resistente a H y control positivo resistente a R. (Anexo 8).
- Mezclar 5µl de cada suspensión de cepas (escala Mac Farland 1) con 5ml del medio 7H9+OADC.
- Dispensar 900µl de cada suspensión de cepas en los 4 pozos de una columna en la placa separada para los controles positivos.
- Cerrar la placa, colocar en la bolsa con cierre hermético y sellar.
- Incubar a 37°C junto a las placas correspondientes a las muestras, procesadas el mismo día.

**C. Etapa post analítica**

**a) Lectura de las placas**

- Retirar las placas de la incubadora para su observación en el microscopio de luz invertida con las bolsas selladas, las cuales no deben abrirse.
- Realizar las lecturas a partir del quinto día de incubación, iniciando por los controles positivos y luego los pocillos sin drogas.



**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

- Realizar las lecturas iniciales con el objetivo de 10X, buscando el temprano crecimiento de las microcolonias; para subsecuentes lecturas, utilizar el objetivo de 4X para examinar todo el contenido de cada pocillo.
- Considerar positivo cuando se observa el crecimiento de 2 o más UFC ( $\geq 2$  UFC) en cada uno de los pozos sin droga (Anexo 9).
- Entre los 5 a 7 días, el crecimiento de MTB se asemeja a pequeñas "curvas", "comas" o "espirales".
- La formación de las colonias, por lo general, progresa a la formación de cordones y luego a un crecimiento irregular más enmarañado.
- No es muy común la contaminación con bacterias u hongos, pero usualmente aparece al quinto día un aspecto turbio y con crecimiento abundante. Si se produce la contaminación, se debe volver a descontaminar y reprocesar las alícuotas de la muestra de contingencia o solicitar una nueva muestra al paciente.
- Los medios de cultivo no deben tener un aspecto turbio con el crecimiento de MTB.
- Los desechos acompañantes en la muestra pueden dificultar la detección temprana de micobacterias, pero con el tiempo las colonias más maduras pueden ser detectadas sobre todo en la periferia de los pozos.
- El crecimiento en un solo pozo (con ausencia de contaminación), o menos de 2 UFC en cada pozo debe considerarse como un resultado indeterminado y se debe solicitar inmediatamente la repetición del proceso de la muestra y la búsqueda de evidencias de contaminación cruzada.

**b) Interpretación de resultados**

Los resultados obtenidos se registran en el sistema informático NetLabV2 y, posteriormente, se procede a la verificación de los mismos. Los/as usuarios/as autorizados/as del sistema NetLabV2 pueden acceder a los resultados en línea desde los diferentes EESS.

**Determinación del crecimiento de micobacterias en los pocillos de las placas.**

Observación de un pozo sin drogas	Interpretación de los hallazgos en los pozos
$\geq 2$ UFC	Positivo
No crecimiento (0 UFC)	Negativo
Crecimiento de 1 UFC	Indeterminado
Sobre crecimiento de bacterias /hongos	Contaminado
<b>Combinando hallazgos en ambos pozos</b>	<b>Interpretación general de los cultivos</b>
Ambos pozos positivos	Positivo



**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

Ambos pozos negativos	Negativo
Uno o dos pozos indeterminado	Indeterminado
Un pozo positivo y otro pozo negativo	Indeterminado
Un pozo positivo y otro pozo indeterminado	Indeterminado
Uno o dos pozos contaminados	Contaminado

**Determinación de la resistencia a medicamentos antituberculosis**

Observación de los pozos (C o D) que contienen drogas	Interpretación de los hallazgos en los pozos
No hay crecimiento (0 UFC)	Sensible
Crecimiento de $\geq 2$ UFC	Resistente
Crecimiento de solo 1 UFC	Indeterminado
Crecimiento de bacterias /hongos	Contaminado

**Interpretación:**

Combinando los hallazgos en ambos pozos (C y D)	Interpretación total de la sensibilidad a las drogas antituberculosis
No hay crecimiento en ninguno de los pozos conteniendo droga antituberculosis	Sensible
Crecimiento solo en el pozo con H	Resistente a H
Crecimiento solo en el pozo con R	Resistente a R
Crecimiento en ambos pozos con drogas	MDR
Crecimiento de 1 UFC en cualquier pozo con droga	Indeterminado para esa droga
Cualquiera de los pozos con droga contaminado	Indeterminado para esa droga



- Los pozos con droga sólo deben examinarse cuando los pozos control (sin droga) son positivos ( $\geq 2$  UFC).
- Los pozos con droga NO deben volver a examinarse después del día que los pozos sin droga hayan sido identificados como positivos. Después de una incubación prolongada, el progreso en el crecimiento en los pozos con droga no es indicativo de resistencia.
- El crecimiento de MTB resistente en los pozos que contienen drogas suele ser fácilmente identificable cuando los pozos sin droga son positivos.

En pocas ocasiones se puede detectar una sola UFC en los pozos que contienen droga; en este caso, la interpretación es considerada como indeterminada.

## 6.5.4 Control de Calidad

### A. Control de calidad interno

#### a) Control de esterilidad de los medios y soluciones preparadas

##### Caldo Middlebrook 7H9:

- Verificar que el medio de cultivo líquido (caldo 7H9) sea transparente, ligeramente amarillo.
- Incubar todos los tubos de cada lote de medio recién preparado a 37°C entre 48 a 72 horas.
- Verificar que el caldo de cultivo incubado se mantenga transparente, si se presenta turbidez descartar todo el lote preparado.

#### b) Controles internos positivos

##### Cepas de referencia para control de calidad:

Cada vez que se realice proceso de muestras por el método MODS, se procesan 3 cepas controles de MTB las cuales son:

- Cepa de MTB H37Rv sensible a todas las drogas antituberculosis.
- Cepa de MTB H37Rv resistente a H.
- Cepa de MTB H37Rv resistente a R.
- El control positivo sensible no debe desarrollarse en los pocillos que contienen la concentración crítica de H y R. Si se observa crecimiento, la prueba no es válida y debe repetirse.
- El control positivo resistente a H debe desarrollarse en el pocillo que contiene la concentración crítica de H. Si no se observa crecimiento, la prueba no es válida y debe repetirse.
- El control positivo resistente a R debe desarrollarse en el pocillo que contiene la concentración crítica de R. Si no se observa crecimiento, la prueba se invalida y debe repetirse.

#### c) Controles internos negativos

- Los controles internos negativos se deben incluir en cada placa junto con las muestras que se procesan diariamente. En estos pocillos no debe haber



**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

crecimiento; de lo contrario, la prueba no es válida y debe repetirse.

Las cepas de referencia para el CC interno deben ser procedentes de ATCC o de los laboratorios supranacionales de la OMS/OPS.

## **B. Control de Calidad Externo**

### **a) Control de calidad externo del Laboratorio de Referencia Regional**

Se realiza de acuerdo al manual de procedimientos para el control de calidad externo de la prueba rápida MODS de sensibilidad a los fármacos antituberculosis.<sup>9</sup>

### **b) Control de calidad externo del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud.**

Se trata de un sistema de evaluación retrospectiva y objetiva de resultados de distintos laboratorios mediante programas organizados por un laboratorio de referencia, denominado PEED. El objetivo principal es comparar los resultados entre laboratorios, de acuerdo con una norma de referencia. Se denomina también prueba de competencia interlaboratoriales.

El control de calidad externo se realiza con cepas que tienen patrón de resistencia conocido, enviadas por el LRNM del INS a los laboratorios que realizan PS. Estas cepas son distribuidas en medios de cultivo LJ a los profesionales para su respectivo proceso y reporte de los resultados.

Los resultados que se obtienen son enviados al LRNM o el que haga sus veces del INS para la evaluación de la concordancia.

## **VII. RESPONSABILIDADES**

### **7.1 NIVEL NACIONAL**

El Instituto Nacional de Salud, a través del LRNM del Centro Nacional de Salud Pública, es responsable de la difusión del presente documento técnico hasta e nivel regional, así como de brindar asistencia técnica, capacitar y supervisar el cumplimiento del mismo.

### **7.2 NIVEL REGIONAL**

Las DIRIS, DIREAS, GERESAs o las que hagan sus veces, a través de los laboratorios correspondientes, son responsables de la difusión, capacitación, supervisión, asistencia técnica y evaluación del cumplimiento del presente documento técnico en su jurisdicción.

### **7.3 NIVEL LOCAL**

Corresponde a los laboratorios la aplicación e implementación del presente documento técnico, en lo que sea pertinente.

## **VIII. ANEXOS**

ANEXO 1: PREPARACIÓN DE LA ESCALA 0.5 Mc FARLAND

ANEXO 2: MÉTODO MODS

ANEXO 3: DISTRIBUCIÓN FINAL DE LA PLACA MODS

ANEXO 4: PREPARACIÓN DEL CALDO MIDDLEBROOK 7H9 PARA MODS

ANEXO 5: PREPARACIÓN DE BUFFER FOSFATO SALINO



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

ANEXO 6: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE (NaOH/CITRATO)

ANEXO 7: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE DROGAS PARA MODS

ANEXO 8: PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS

ANEXO 9: LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA MODS

ANEXO 10: CRIOCONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE LOS CULTIVOS MODS

ANEXO 11: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA PRUEBA DE SENSIBILIDAD EN MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO CON INIDICADOR DE CRECIMIENTO DE MICOBACTERIAS

ANEXO 12: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA LA PRUEBA MODS A

ANEXO 13: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA LA PRUEBA MODS B

ANEXO 14: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DEL CALDO MIDDLEBROOK 7H9 PARA MODS.

ANEXO 15: FORMULARIO DE PRODUCTO FINAL Y CONTROL DE ESTERILIDAD DE MEDIO DE CULTIVO 7H9 PARA MODS.

ANEXO 16: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DE BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) PARA MODS.

ANEXO 17: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DE SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE PARA MODS.

ANEXO 18: AJUSTES PARA CALCULAR LA POTENCIA DE LAS DROGAS.



## ANEXO 1: PREPARACIÓN DE LA ESCALA 0.5 Mc FARLAND

### Reactivos:

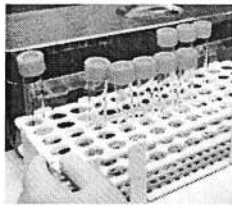
- Cloruro de Bario dihidratado ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Peso Molecular: 244.28g/mol
- Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 97 % Q.P.

### Procedimiento:

- Agregar 0.5ml de  $\text{BaCl}_2$  0.048 M (1.175% P/V  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) a 99.5ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.18M (1% v/v). Mientras agrega el  $\text{BaCl}_2$  mantenga la suspensión continua.
- Verificar la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro.
- El estándar 0.5 de escala Mc Farland, absorbancia de 0.08 – 0.13 a 625nm.



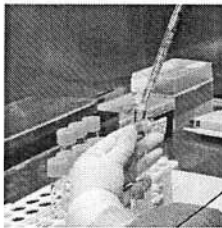
## ANEXO 2: MÉTODO MODS



1 Dispensar 4.5ml de medio 7H9, a los tubos de trabajo.



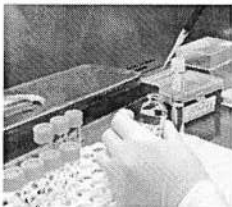
6 Muestra de esputo con volumen no menor a 2ml.



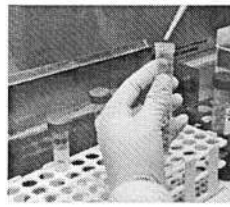
2 Añadir 0.5ml OADC al medio 7H9 (7H9-OADC).



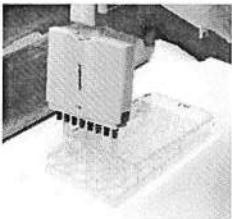
7 Trasvasar 2ml de muestra de esputo a un tubo Falcon de 15ml o 50ml.



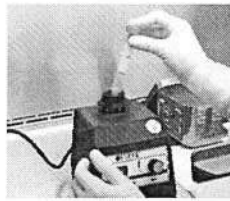
3 Reconstituir el PANTA, agregar 100µl (7H9-OADC-PANTA).



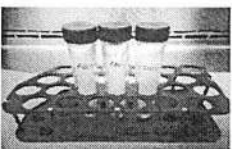
8 Agregar 2ml de la solución NaOH -NALC.



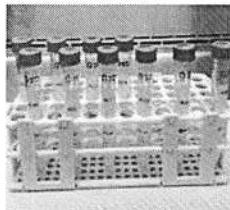
4 Preparar la solución de trabajo de la droga en la placa de 24 pozos (100µl de INH y RIF a cada pozo).



9 Mezclar con vórtex los tubos por 20s, mover el tubo por inversión para homogeneizar.

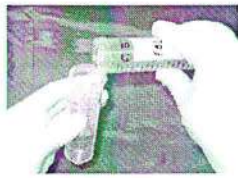


5 Dispensar los volúmenes requeridos del stock de NaOH-citrato de Na, Buffer fosfato y pesar el NALC cantidad necesaria.

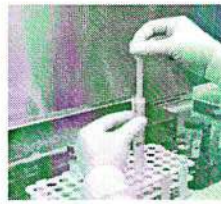


10 Dejar reposar por 15 minutos dentro de la CSB.

DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.



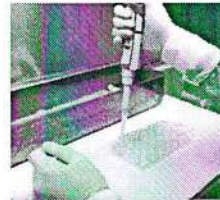
11 Agregar PBS por muestra.



16 Homogeneizar bien la suspensión evitando la formación de burbujas de aire.



12 Centrifugar por 15 min a 3 000 g.



17 Distribuir 900µl, de la suspensión final de la muestra, hasta que la placa este llena, excepto la columna 3.



13 Decantar el sobrenadante.



18 Dispensar 900µl del medio 7H9-OADC-PANTA, sin muestra en los 4 pozos de la columna 3 (controles negativos internos).



14 Resuspender el sedimento con 2ml de 7H9-OADC-PANTA y adicionar 1ml al tubo con 7H9-OADC-PANTA restante.



19 Cerrar las placas con su respectiva tapa y colocar en una bolsa de cierre hermético.



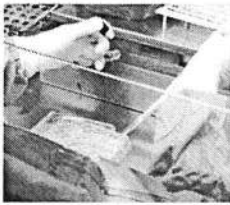
15 Sembrar en medio sólido L-J 0.2ml x tubo, y guardar el resto como muestra de contingencia.



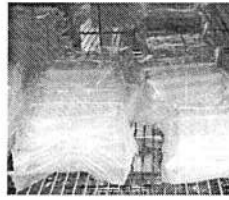
20 Mezclar 5µl de cada suspensión escala de 1 de Mac Farland con 5ml de medio 7H9-OADC.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.



21 Dispensar los controles positivos en los pozos no utilizados, donde se preparó la solución de antibióticos.



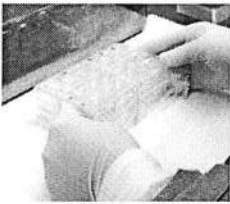
24 Incubar a 37°C junto a las placas de las muestras procesadas el mismo día.



22 Cerrar la placa y colocar en una bolsa de cierre hermético.



25 Las lecturas se realizan a partir del 5to día a través de un microscopio de luz invertida, iniciándose por los controles internos.



23 Asegurar con ligas las placas de los controles positivos conjuntamente con las placas de muestras.



26 El crecimiento de MTB parece como pequeñas curvas, comas o espirales.

Imágenes propias del LRNM - INS.



ANEXO 3: DISTRIBUCIÓN FINAL DE LA PLACA MODS

Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Control sin droga	Control sin droga	Control Negativo	Control sin droga	Control sin droga
Control sin droga	Control sin droga	Control Negativo	Control sin droga	Control sin droga
INH 0,4	INH 0,4	Control Negativo	INH 0,4	INH 0,4
RIF 1,0	RIF 1,0	Control Negativo	RIF 1,0	RIF 1,0



## ANEXO 4: PREPARACIÓN DEL CALDO MIDDLEBROOK 7H9 PARA MODS

### Medio líquido Middlebrook 7H9 con casitona y glicerol

#### Componentes:

- Caldo base Middlebrook 7H9 5.9g.
- Glicerol 3.1ml.
- Casitona 1.25g.
- Agua destilada estéril 900ml.

#### Procedimiento:

- Disolver 5.9 g del medio 7H9 en polvo en 900ml de agua destilada estéril, conteniendo 3.1ml de glicerol y 1.25g de casitona.
- Mezclar en constante agitación hasta que esté completamente disuelto (se recomienda usar pastillas magnéticas en el mezclador).
- Esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Enfriar y alicuotar 4.5ml del medio en tubos de vidrio estériles de 16x 100mm para las muestras y alícuotas de 10.8ml para la preparación de las soluciones de las drogas y para los controles internos.
- Incubar todos los tubos a 37°C por 48 a 72 horas.
- Luego dejar los tubos a temperatura ambiente durante las subsiguientes 48 horas para controlar la esterilidad (que se traduce como ausencia de turbidez).
- Registrar el lote, la fecha de preparación y el volumen.
- Registrar el día en que se pone en uso y el día en que se termine cada lote.
- Almacenar el frasco y los tubos con las alícuotas de medio 7H9 con las tapas bien cerradas a 2°C - 8°C por el periodo de un mes.

#### Notas:

- Cada muestra de esputo y los controles internos requieren tubos que contengan 4.5ml de medio 7H9.
- Cada tubo con 10.8ml de medio 7H9 es suficiente para preparar las soluciones de las drogas y para los controles internos de 15 muestras de esputo. La cantidad a prepararse depende de las necesidades de cada laboratorio.
- Si se almacena en frascos de mayor volumen, se puede repartir el medio de forma estéril el mismo día de proceso de las muestras.



## ANEXO 5: PREPARACIÓN DE BUFFER FOSFATO SALINO

### BUFFER FOSFATO

Buffer fosfato pH 6.8; 0.067M

#### Componentes:

Fosfato de sodio di-básico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	9.47g
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en cristales	9.07g
Agua destilada	2 000ml

#### Preparación:

##### Solución A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Fosfato de sodio dibásico):

- Disolver 9,47g de fosfato de sodio dibásico en 1000ml de agua destilada.

##### Solución B: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Fosfato de potasio monobásico).

- Disolver 9,07g de fosfato de potasio monobásico en 1000ml de agua destilada.

##### Solución final del buffer fosfato (pH 6,8):

- (Un volumen aproximado de 1 900ml – es suficiente para al menos 190 muestras)
- Se recomienda que las soluciones stock (el volumen total) sean preparadas con anticipación. El volumen total de las soluciones stock y las alícuotas que serán almacenadas, pueden ajustarse de acuerdo a las necesidades del laboratorio.

#### Procedimiento:

- Mezclar 950ml de la solución A con 950ml de la solución B, separar 50ml de cada solución para ajustar el pH si fuera necesario.
- Medir el pH, debe estar a  $\text{pH } 6.8 \pm 0.2$ . Para ajustar: Añadir la solución A para aumentar el pH. Añadir la solución B para bajar el pH.
- Esterilice en la autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.
- Rotular con el nombre del buffer y fecha de preparación.
- Para confirmar la esterilidad de la solución buffer fosfato, colocar una alícuota de 100 $\mu\text{l}$  en un medio de agar nutritivo e incubar por 48 h a  $37^\circ\text{C}$ .
- Almacenar en el refrigerador a  $2^\circ\text{C} - 8^\circ\text{C}$  por un mes.

#### Nota:

- Cada muestra de esputo requiere 10ml de la solución buffer fosfato (pH 6.8).
- La solución buffer estéril puede ser almacenada en botellas estériles de 50 - 200ml para ser usadas en el día o ser almacenada en volúmenes mayores. Si se almacenan en volúmenes mayores, se puede alícuotar la cantidad necesaria de buffer el mismo día del proceso de las muestras, usando técnicas estériles.



## ANEXO 6: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE (NaOH/CITRATO)

Solución stock de NaOH – Citrato de Na (4% NaOH/2.9% citrato de sodio para la descontaminación de las muestras de esputo)

(400ml – suficiente para 200 muestras)

### Componentes:

Hidróxido de sodio	8.0g
Citrato de sodio	5.8g
Agua destilada	400ml

### Procedimiento:

- Disolver 8.0g de hidróxido de sodio en 200ml de agua destilada.
- Disolver 5.8g de citrato de sodio en otros 200ml de agua destilada.
- Combinar las soluciones de hidróxido de sodio y citrato de sodio (en volúmenes iguales).
- Mezclar y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Rotular con el nombre del reactivo y fecha de preparación.
- Almacenar en refrigeración a 2°C - 8°C por un mes.

### Nota:

- Cada 2ml de muestra de esputo requiere 2ml de solución NaOH – Citrato de Na.
- Se puede almacenar la solución stock en alícuotas de menor volumen usando tubos tapa rosca, el volumen apropiado va a depender de la cantidad de muestras que se procesan por día. Disolver 0.1g de los cristales de NALC por cada 20ml de la solución de descontaminación (0.5% de NALC en NaOH-citrato de Na = Solución de descontaminación NaOH-NALC).



### Preparación de la solución de descontaminación

Número de muestras	NaOH- Na Citrato (ml)	NAL C (g)
10	20	0.1
20	40	0.2
50	100	0.5
100	200	1.0

## ANEXO 7: PREPARACIÓN DE SOLUCIONES STOCK DE DROGAS PARA MODS

### STOCK DE H (8 mg/ml)

#### Componentes:

Isoniacida	20mg
Agua destilada estéril	2.5ml

#### Procedimiento:

- Disolver completamente 20mg de H en 2.5ml de agua destilada estéril.
- Filtrar empleando un filtro para jeringa de 0.2µm para solventes acuosos.
- Almacenar en alícuotas de 20µl en tubos estériles de microcentrífuga a -20°C hasta por un mes.

#### Nota:

Cada alícuota almacenada de 20µl es suficiente para 100 muestras (incluyendo sobrantes).

### STOCK DE R (8mg/ml)

#### Componentes

Rifampicina	20mg
Dimetil sulfoxido	1.25ml
Agua destilada estéril	1.25ml

#### Procedimiento:

- Disolver completamente 20mg de R en 1.25ml de DMSO.
- Añadir 1.25ml de agua destilada estéril y mezclar.
- Filtrar empleando un filtro de jeringa de 0.2µm para solventes orgánicos.
- Almacenar en alícuotas de 20µl en tubos estériles de microcentrífuga a -20°C hasta por un mes.

#### Nota:

- Cada alícuota almacenada de 20µl es suficiente para 100 muestras.
- Cada alícuota congelada de 8mg/ml de la solución stock de antibiótico es suficiente para 100 pozos de H o R.
- Los volúmenes de 2ml de medio y la solución de trabajo de las drogas preparadas en la columna 2 son suficientes para 2 placas de MODS (que corresponde hasta 10 muestras, más 2 controles negativos y 3 controles positivos).
- Si se van a procesar más muestras se puede emplear la columna 3 (y la columna 4 si fuera necesario), de la misma manera que la columna 2 (colocar 2 ml de 7H9-OADC en la columna 3 y seguir el procedimiento antes mencionado).



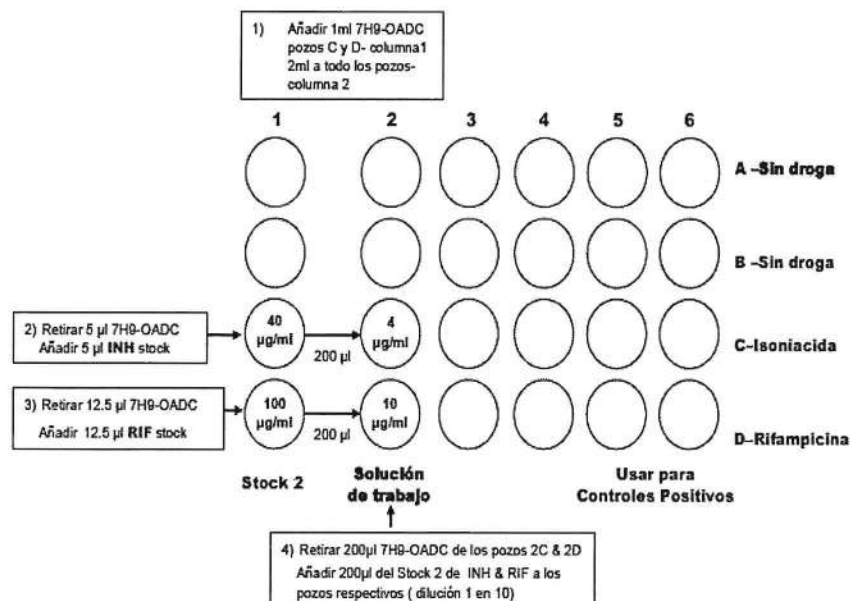
**DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.**

- Cuando se realicen los cálculos para la preparación de la solución de trabajo, recordar incluir los controles negativos en cada placa, controles positivos y posibles pérdidas.
- No congele o re-use la solución stock y la solución de trabajo de la droga porque la actividad se puede perder. Descartar al final todo el resto de la solución stock sobrante.

**Dilución de la solución de trabajo de las drogas**

Solución stock de drogas	Dilución del stock en 7H9-OADC para generar el stock 2	Dilución del stock 2 en 7H9-OADC para generar la solución de trabajo	Concentración final en los pozos cuando se añade la muestra (µg/ml)
Isoniacida <b>8 mg/ml</b>	5 µL stock/995 µL 7H9-OADC <b>(40 µg/ml)</b>	1/10 <b>4 µg/ml</b>	0.4
Rifampicina <b>8 mg/ml</b>	12.5 µL stock/987.5 µL 7H9-OADC	1/10 <b>10 µg/ml</b>	1.0

Desembolsar las placas estériles y rotular los cuadrantes de las placas con las abreviaturas de cada una de las drogas.



## ANEXO 8: PREPARACIÓN DE CONTROLES POSITIVOS

La preparación de la suspensión de bacterias ajustada a la escala Mac Farland N°1 deben llevarse a cabo sólo en CBS clase II, tipo A2. Si las cepas control no están comercialmente disponibles, se pueden emplear cepas locales caracterizadas y con un patrón de sensibilidad conocido de cepa sensible a todas las drogas, y cepa mono resistente a R y mono resistente a H.

### Requisitos:

- Cepa H37Rv ATCC (control sensible) o cepa de referencia pan sensible.
- Cepa mono resistente a R
- Cepa mono resistente a H.
- Agar Middlebrook 7H11 – 5% OADC en placas Petri
- Solución estéril de polisorbato 80 al 10% 40µl
- Agua destilada estéril 10ml

### Procedimiento:

- Reconstituir con la solución acompañante la cepa control comercialmente preparado.
- Colocar la solución de la cepa en una placa Petri conteniendo agar Middlebrook 7H11 (Recuperación y crio preservación de cultivos positivos de MODS).
- Incubar a 37°C por 15-20 días.
- El mismo día de la preparación de la suspensión de la cepa (Mac Farland 1), mezclar 10ml de agua destilada estéril y 40µl de solución estéril de polisorbato 80 al 10% en un tubo estéril (concentración final de polisorbato = 0,04 %).
- Utilizando un asa de siembra estéril, extraer varias colonias de micobacterias y colocarlas en un tubo estéril con perlas de vidrio que contenga 100µl de la solución salina polisorbato 80.
- Asegurar fuertemente la tapa del tubo y mezclar en el agitador por 2 - 3 minutos; dejar reposar por 5 minutos.
- Abrir el tubo y añadir 3ml de la solución salina polisorbato 80, asegurar bien la tapa del tubo, mezclar en el agitador por 20 segundos y dejar reposar por 30 minutos
- Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril empleando una pipeta de transferencia.
- Ajustar la turbidez a la escala 1.0 de Mac Farland (aprox. 3x10<sup>8</sup> UFC/ml) con solución salina polisorbato 80.
- La suspensión bacteriana a escala 1.0 Mac Farland se mantiene sellada y refrigerada a 2 - 8°C para ser empleada posteriormente por un periodo no mayor a 15 días.
- El resto de colonias que quedan en la placa petri puede ser: Repicados en una nueva placa Petri con agar 7H11 para mantener futuros repiques.
- Prepararlas para congelarlas por un largo periodo de tiempo.



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

**Nota:**

- Las cepas bien caracterizadas de MTB (una cepa sensible y cepas mono resistentes a H y R) son usados como controles positivos, se emplean cada vez que se procesan muestras para MODS. Los controles positivos evalúan la calidad del medio y la efectividad de los antibióticos. Para disminuir el riesgo de contaminación cruzada, estos controles positivos son procesados y colocados en una placa diferente, este proceso se realiza después que las muestras hayan sido procesadas y selladas en bolsas plásticas de cierre hermético. Para evaluar la contaminación cruzada se debe de correr los controles internos negativos en cada placa.



## ANEXO 9: LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA MODS

Los resultados para la mayoría de las muestras procesadas por MODS son claramente positivos (muchas colonias) o claramente negativos (no hay crecimiento). La dificultad se presenta únicamente cuando el crecimiento es mínimo, o si la contaminación está presente.

Pozo A	Pozo B	Interpretación
+	+	POSITIVO
-	-	NEGATIVO
+	C	CONTAMINADO
C	+	CONTAMINADO
-	C	CONTAMINADO
C	-	CONTAMINADO
C	C	CONTAMINADO
+/-	C	CONTAMINADO
C	+/-	CONTAMINADO
+	-	INDETERMINADO
-	+	INDETERMINADO
+	+/-	INDETERMINADO
+/-	+	INDETERMINADO
-	+/-	INDETERMINADO
+/-	-	INDETERMINADO
+/-	+/-	INDETERMINADO
+ significa $\geq 2$ ufc en el pozo +/- significa 1 ufc en el pozo - significa no crecimiento en el pozo		



DOCUMENTO TÉCNICO:  
MANUAL DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS.

Sensibilidad a Isoniacida y Rifampicina		
Pozo C H 0.4µg/ml	Pozo D R 1.0 µg/ml	Interpretación
+	+	MDR
-	-	Sensible a Isoniacida y rifampicina
+	-	Resistente a isoniacida, sensible a rifampicina
+	C	Resistente a isoniacida, rifampicina indeterminado
+	+/-	Resistente a isoniacida, rifampicina indeterminado
-	+	Sensible a Isoniacida y resistente a rifampicina,
C	+	Isoniacida indeterminado, resistente a rifampicina
+/-	+	Isoniacida indeterminado, resistente a rifampicina.
<p>+ significa <math>\geq 2</math>ufc en el pozo                      +/- significa 1 ufc en el pozo                      - significa no crecimiento en el pozo                      C significa contaminación en el pozo y no crecimiento visible de MTB</p>		



## ANEXO 10: CRIOPRESERVACIÓN DE LAS CEPAS DE LOS CULTIVOS MODS

Preparación del caldo Middlebrook 7H9 con 10% de glicerol para la criopreservación de cepas.

### Componentes:

- Caldo base Middlebrook 7H9	0.94g
- Glicerol	20ml
- Agua destilada estéril	160ml
- Suplemento ADC	20ml

### Procedimiento:

1. Disolver 0.94g del caldo base Middlebrook 7H9 en 160ml de agua destilada estéril y añadir 20ml de glicerol.
2. Agitar constantemente (se puede emplear un agitador magnético) hasta que se disuelva por completo.
3. Esterilizar en la autoclave a 121°C por 15 minutos.
4. Dejar que baje la temperatura y añadir 20ml del suplemento ADC.
5. Mezcle bien y verifique la esterilidad del medio incubándolo a 37°C por 24 - 48 horas
6. Dispense 0.9ml en crioviales en condiciones estériles, asegure bien la tapa y almacene a 2°C - 8°C.

**Nota:** para este proceso se emplea ADC y no OADC

### Criopreservación de cepas

1. Colocar en la cabina de bioseguridad biológica las placas Petri con agar 7H11 que contiene los subcultivos (cepas) obtenidas a partir de MODS.
2. Abrir la placa Petri con cuidado y coseche las colonias con una espátula estéril. Añadir la cepa a cada criovial conteniendo caldo 7H9 con 10% de glicerol.







**ANEXO 12: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA LA PRUEBA MODS A**

Logo de la Institución		FORMULARIO										FOR.		
		PRUEBA DE CULTIVO Y DE SENSIBILIDAD A FARMACOS POR EL MÉTODO DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS) A										Placa N°	Edición N°	
Responsable del proceso	Lectura	1 <sup>ra</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>ra</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>ma</sup>	8 <sup>va</sup>	Interpretación resultados		de		
	Fecha													
Fecha de proceso	C <sub>1</sub>										Cultivo			
	C <sub>2</sub>													
	H <sub>0,4</sub>										Sensibilidad			
	R <sub>1,0</sub>													
Código de Controles Positivos	MDR	H <sub>37</sub> Rv												
		C <sub>1</sub>												
		C <sub>2</sub>											Cultivo	
		H <sub>0,4</sub>											Sensibilidad	
		R <sub>1,0</sub>												
Fecha de Resultados:														







**ANEXO 13: FORMULARIO DE RESULTADOS PARA LA PRUEBA MODS B**

Logo de la Institución	FORMULARIO										FOR.	
											Placa N°	
	PRUEBA DE CULTIVO Y DE SENSIBILIDAD A FARMACOS POR EL MÉTODO DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS) B										Edición N°	
Código de Positivos	Controles	Lectura	1 <sup>ra</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>ra</sup>	4 <sup>ta</sup>	5 <sup>ta</sup>	6 <sup>ta</sup>	7 <sup>ma</sup>	8 <sup>va</sup>	Interpretación de resultados	
		Fecha										
Código muestra	Código Origen	de	C <sub>1</sub>								Cultivo	
			C <sub>2</sub>									
			H <sub>0,4</sub>								Sensibilidad	
			R <sub>1,0</sub>									
Código muestra	Código Origen	de	C <sub>1</sub>								Cultivo	
			C <sub>2</sub>									
			H <sub>0,4</sub>								Sensibilidad	



**ANEXO 14: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DEL CALDO MIDDLEBROOK 7H9 PARA MODS**

Logo de la Institución	<b>FORMULARIO</b>	FOR
	<b>INFORMACIÓN GENERAL DEL CALDO MIDDLEBROOK 7H9</b>	Edición:

INSUMOS	INFORMACIÓN DE LOS INSUMOS				N° Lote	Fecha de preparación Analista responsable
	Marca	N° Lote	F. Apertura	F. Expiración		
Middlebrook 7H9 Broth Base						Lote:
Caseína pancreática						Fecha:
Glicerina 99.5 %						Responsable:
Agua destilada						
Middlebrook 7H9 Broth Base						Lote:
Caseína pancreática						Fecha:
Glicerina 99.5 %						Responsable:
Agua destilada						



**ANEXO 15: FORMULARIO DE PRODUCTO FINAL Y CONTROL DE ESTERILIDAD  
 DE MEDIO DE CULTIVO 7H9 PARA MODS**

Logo de la Institución	FORMULARIO								FOR		
	PRODUCTO FINAL Y CONTROL DE ESTERILIDAD DEL CALDO 7H9								Edición:		
PRODUCTO FINAL						CONTROL DE INCUBACIÓN A 37° C					
N° Lote del Medio	Fecha de Preparación	Fecha de Expiración	pH	Almacenamiento	Analista Responsable	N° Tubos Control	24 Hrs.	48 Hrs.	Controlado por:	Observaciones	
				4 - 8° C							



**ANEXO 16: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DE BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) PARA MODS**

Logo de la Institución	FORMULARIO					FOR
	INFORMACIÓN GENERAL DEL BUFFER FOSFATO SALINO (PBS)					Edición:
INSUMOS	INFORMACIÓN DE LOS INSUMOS					N° Lote Fecha de preparación Analista responsable
	Marca	N° Lote	F. Apertura	F. Expiración	Cant. Usada	
Fosfato de sodio dibásico						Lote:
Fosfato de potasio monobásico						Fecha:
Agua destilada						Responsable:
Fosfato de sodio dibásico						Lote:
Fosfato de potasio monobásico						Fecha:
Agua destilada						Responsable:
Fosfato de sodio dibásico						Lote:
Fosfato de potasio monobásico						Fecha:
Agua destilada						Responsable:
Fosfato de sodio dibásico						Lote:
Fosfato de potasio monobásico						Fecha:
Agua destilada						Responsable:



**ANEXO 17: FORMULARIO DE INFORMACIÓN GENERAL DE SOLUCIÓN  
 DESCONTAMINANTE PARA MODS**

Logo de la Institución	FORMULARIO					FOR
	INFORMACIÓN GENERAL DE LA SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE					Edición:
INSUMOS	INFORMACIÓN DE LOS INSUMOS					N° Lote Fecha de preparación Analista responsable
	Marca	N° Lote	F. Apertura	F. Expiración	Cant. Usada	
Hidróxido de sodio (NaOH)						Lote:
Citrato de sodio						Fecha:
Agua destilada						Responsable:
Hidróxido de sodio (NaOH)						Lote:
Citrato de sodio						Fecha:
Agua destilada						Responsable:
Hidróxido de sodio (NaOH)						Lote:
Citrato de sodio						Fecha:
Agua destilada						Responsable:
Hidróxido de sodio (NaOH)						Lote:
Citrato de sodio						Fecha:
Agua destilada						Responsable:
Hidróxido de sodio (NaOH)						Lote:
Citrato de sodio						Fecha:
Agua destilada						Responsable:



ANEXO 18: AJUSTES PARA CALCULAR LA POTENCIA DE LAS DROGAS

		BEDAQUILINA FUMARATO	CLOFAZIMINA	LINEZOLID	LEVOFLOXACINA
N° de lote de acuerdo a la procedencia de la droga		A17HB1824	SLCC9241	015M4715V	115M4888V
Información declarada por el fabricante	Potencia	no declarada	no declarada	no declarada	no declarada
	Pureza	99.3%	100%	99.2%	99.9%
Información declarada o no por el fabricante	Formula	C36H35BrN2O6	C27H22CL2N4	C16H20FN3O4	C18H20FN3O4
	Peso molecular	671.6	473.4	337.35	361.37
Cálculos realizados en el laboratorio	Contenido de agua	no contiene			
	Peso molecular de la sal	116			
	Peso molecular del agua	.....			
	Peso molecular del antibiotico libre de sal y agua	671.6 - 116 = 555.6			
	Proporcion del antibiotico en la droga adquirida	$555.6/671.6=0.8272(82.72\%)$			
	Potencia (%)	$82.72 \times 99.30/100 = 82.14$	100	99.2	99.9
	Potencia (ug/mg)	821	1000	992	999



## IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. 2005. Bioseguridad en Laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos Serie de Normas Técnicas N°18.
- 2) Organización Mundial de la Salud. 2013. Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis. Ginebra, Suiza.
- 3) Organismo Andino de Salud-Convenio Hipólito Unanue. 2017. Guía técnica para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 3. Pruebas de sensibilidad. Lima.
- 4) Kent, P.T y Kubica, G.P. 1985. Public Health Micobacteriology: A Guide for the Level III Laboratory Centers for Disease. Atlanta- Georgia.
- 5) Siddiqi S & Rüsck-Gerdes S. 2006. MGIT TM Procedure Manual for BACTEC™ MGIT 960™ TB System. Fundation for Innovative Diagnostics.
- 6) BD BBL TM MGIT 960 SIRE Kits. For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis.
- 7) BD BACTEC MGIT 960 PZA-Kit. Para el análisis de sensibilidad antimicrobiana de Mycobacterium tuberculosis.
- 8) Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud. 2011. Susceptibilidad a drogas de Mycobacterium tuberculosis mediante observación microscópica (MODS). Lima.
- 9) Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. 2012. Procedimientos para el control de calidad externo de la prueba rápida MODS (Microscopic Observation Direct Susceptibility) de sensibilidad a los fármacos antituberculosos. 1ra edición. Lima.
- 10) World Health Organization. 2018. Global tuberculosis report 2018. Francia.
- 11) WHO/HSE/EPR.2008. Guía sobre la reglamentación relativa al Transporte de sustancias infecciosas 2009–2010
- 12) WHO. 2008 Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO/HTM/TB/2008.392.
- 13) Global laboratory Initiative a Working Group of the stop Partnership 2014. Mycobacteriology Laboratory manual. First edition.
- 14) World Health Organization. 2018. Technical manual for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of tuberculosis.

