



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS MULTIDROGO-RESISTENTE EN PACIENTES DE LIMA
METROPOLITANA**

Línea de investigación:

Microbiología, parasitología e inmunología

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional de
Licenciada de Biología

Autora:

Ríos Gutiérrez, Lidabel Marina

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés
(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurado:

Rodrigo Rojas, María Elena
Velarde Vílchez, Mónica Margarita
Mayanga Herrera, Ana Lucía

Lima - Perú

2022

Referencia:

Ríos, L. (2022). *Métodos bacteriológicos utilizados en el diagnóstico de tuberculosis multidrogo-resistente en pacientes de Lima Metropolitana*. [Trabajo de suficiencia profesional, Universidad Nacional Federico Villarreal]. Repositorio Institucional UNFV. <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/5783>



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada (CC BY-NC-ND)

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede generar obras derivadas ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

**“MÉTODOS BACTERIOLÓGICOS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE
TUBERCULOSIS MULTIDROGO-RESISTENTE EN PACIENTES DE LIMA
METROPOLITANA”**

Línea de investigación:

Microbiología, Parasitología e Inmunología

Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional
de Licenciada de Biología

Autora:

Ríos Gutiérrez, Lidabel Marina

Asesor:

Salas Asencios, Ramsés

(ORCID: 0000-0002-4075-1736)

Jurados:

Rodrigo Rojas, María Elena

Velarde Vílchez, Mónica Margarita

Mayanga Herrera, Ana Lucia

Lima – Perú

2022

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por el apoyo incondicional brindado durante toda mi formación profesional, a mi alma máter, a todos mis profesores por sus enseñanzas y a mi asesor por su tiempo brindado.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
I. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Trayectoria del autor	8
1.2. Descripción de la empresa	9
1.3. Organigrama de la Empresa.....	12
1.4. Áreas y funciones desempeñadas.....	13
II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	16
2.1. Tuberculosis.....	16
2.1.1. Historia de la tuberculosis.....	16
2.2. Definición	18
2.3. Mecanismo de transmisión.....	18
2.4. Epidemiología	21
2.5. La tuberculosis multidrogo-resistente (TB-MDR) y la tuberculosis extensamente resistente (TB-XDR).....	23
2.5.1. Evaluación de la resistencia microbiana	24
2.6. Tratamiento de la TB	25
2.7. Métodos bacteriológicos para el diagnóstico de TB	26
2.7.1. Descontaminación de muestras respiratorias por el método NALC-NaOH.....	29
2.7.1.1. Procesamiento de muestras paso a paso.....	30
2.7.2. Baciloscopia (BK) mediante tinción Ziehl Neelsen.....	33
2.7.2.1. Extendidos y fijación de muestras para la baciloscopia.....	34
2.7.2.2. Tinción de extendidos de muestras	35
2.7.2.3. Lectura en el microscopio	37
2.7.2.4. Interpretación	38
2.7.3. Identificación del Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
2.7.3.1. Procesamiento de la Muestra	39
2.7.3.2. Inoculación en el TBc Identification Test.....	39
2.7.3.3. Interpretación de la prueba.....	40
2.7.4. Determinación de la susceptibilidad a drogas antituberculosas de primera línea en BACTEC MGIT 960®.....	41
2.7.4.1. Reconstitución de las drogas SIRE	43
2.7.4.2. Reconstitución de Droga PZA	43
2.7.4.3. Preparación de tubos con y sin droga.....	44
2.7.4.4. Preparación del Inóculo Bacteriano	44
2.7.4.5. Dilución para Controles	46
2.7.4.6. Incubación.....	46

2.7.5.	Determinación de la susceptibilidad a drogas antituberculosas de segunda línea en BACTEC MGIT 960®.....	47
2.7.5.1.	Reconstitución de drogas comerciales BD.....	48
2.7.5.2.	Preparación de tubos con y sin droga.....	48
2.7.5.3.	Preparación del Inóculo Bacteriano	49
2.7.5.4.	Dilución Para Controles	50
2.7.5.5.	Incubación.....	50
2.7.6.	Criopreservación de aislamientos para <i>M. tuberculosis</i>	51
2.7.6.1.	Rotulado de materiales.....	52
2.7.6.2.	Criopreservación en medios.....	52
2.7.7.	Ensayo con Sondas en Línea (LPA).....	55
2.7.7.1.	Genotype MTBDR <i>plus</i> v.2.0	55
A.	Extracción de ADN	56
B.	Amplificación múltiple (PCR Multiplex).....	57
C.	Hibridación	58
D.	Evaluación e Interpretación del patrón representativo	61
2.7.7.2.	Ensayo Genotype MTBDR <i>sl</i> v.2.0.....	63
A.	Evaluación e Interpretación de los resultados	64
2.7.8.	Análisis estadístico de resultados.....	66
2.7.8.1.	Tiempo de crecimiento de <i>M. tuberculosis</i>	66
2.7.8.2.	Concordancias entre pruebas.....	66
2.7.9.	Resultados	67
2.7.9.1.	Resultado de baciloscopia	67
2.7.9.2.	Resultados de medios de cultivos	68
A.	Resultado de cultivo líquido MGIT	68
B.	Resultado de cultivo sólido LJ	68
2.7.9.3.	Resultados de Genotype MTBDR <i>plus</i>	69
2.7.9.4.	Resultados obtenidos por cada muestra	70
2.7.9.5.	Velocidad de crecimiento de <i>M tuberculosis</i> , en medios de cultivo LJ y MGIT ..	70
2.7.9.6.	Concordancia entre los métodos de laboratorio evaluados	71
III.	APORTES MÁS DESTACABLES A LA EMPRESA	72
IV.	CONCLUSIONES	73
V.	RECOMENDACIONES	75
VI.	REFERENCIAS.....	76
VII.	ANEXOS	87

RESUMEN

El diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis ha venido siendo uno de los pilares básicos para combatir la enfermedad. El tamizaje de la población sintomática respiratoria mediante la realización de la baciloscopía y sembrado del esputo descontaminado en medios de cultivo líquido y sólido, permiten diagnósticos certeros y ofrecen la posibilidad de un seguimiento de la enfermedad durante el tratamiento que asegure la curación. Sin embargo, a pesar de la utilidad de estos exámenes sumados a la incorporación progresiva de pruebas de susceptibilidad a los fármacos, la tuberculosis continúa siendo hoy en día una epidemia. El objetivo de este trabajo es comparar los métodos bacteriológicos utilizados en el diagnóstico de la tuberculosis multidrogo-resistente en pacientes de Lima Metropolitana para implementar un método que acorte el tiempo de detección y favorezca la rapidez en la emisión del resultado. Para ello se procesan un total de 106 muestras de esputo crudo por el método NALC-NaOH y con el pellet concentrado se hace un extendido en lámina y se realiza un sembrado en medios de cultivo y de la mayor carga bacilar se realiza la extracción de ADN para el diagnóstico molecular. Los resultados del Genotype 1L presenta una mayor tasa de detección frente a los otros métodos de diagnóstico permitiendo la detección rápida y la rapidez del resultado.

Palabras clave: tamizaje, método Nalc-NaOH, extracción de ADN

ABSTRACT

The bacteriological diagnosis of tuberculosis has been one of the basic pillars to combat the disease. The screening of the respiratory symptomatic population through smear microscopy and seeding of decontaminated sputum in liquid and solid culture media allows accurate diagnoses and offers the possibility of monitoring the disease during treatment to ensure cure. However, despite the usefulness of these tests coupled with the progressive incorporation of drug susceptibility tests, tuberculosis continues to be an epidemic today. The objective of this work is to compare the bacteriological methods used in the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis in patients from Metropolitan Lima to implement a method that shortens the detection time and favors the speed in the issuance of the result. For this, a total of 106 raw sputum samples are processed by the NALC-NaOH method and with the concentrated pellet a spread is made on a slide and a seeding is carried out in culture media and the DNA extraction is carried out from the highest bacillary load for molecular diagnostics. The results of the Genotype 1L present a higher detection rate compared to other diagnostic methods allowing rapid detection and rapidity of the result.

Keywords: screening, Nalc-NaOH method, DNA extraction

I. INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis Multidrogo-resistente (TB-MDR) es causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que son resistentes a los dos medicamentos antituberculosos más potentes en el tratamiento estándar, estas son Isoniazida (INH) y Rifampicina (RIF) que son la columna vertebral del tratamiento antituberculoso de primera línea, para los casos conocidos como Extensamente drogo resistente llamados (TB-XDR) por sus siglas en inglés "extensively drug-resistant tuberculosis", estas son cepas TB-MDR que además son resistentes a las fluoroquinolonas (Levofloxacin, Ofloxacin y Moxifloxacin) y al menos a uno de los antibióticos inyectables de segunda línea (Kanamicina, Amikacina o Capreomicina). Estas cepas resistentes de *M. tuberculosis* implican un alto gasto en medicamentos y largo tiempo en tratamiento de difícil curación (Caminero, 2010). Asimismo, se han detectado cepas de tuberculosis que son resistentes a los antibióticos de primera y segunda línea de tratamiento, a estas cepas algunos autores las han denominado Tuberculosis "totalmente drogo-resistente" (Velayati et al., 2013).

La TB-MDR es la forma más severa de tuberculosis, tanto para la salud individual como para la salud pública, por la relativa facilidad de su transmisión a través de la vía aérea. El Perú tiene el mayor número de casos de TB-MDR en América, por lo menos desde mediados de los años 1990 hasta el 2017 (Jave et al., 2017).

Existen actualmente algunas técnicas de diagnóstico rápido basadas en biología molecular, una de las más conocidas es la desarrollada por la empresa Hain Lifescience que permiten un diagnóstico bacteriológico rápido con la posibilidad de conocer la susceptibilidad a los fármacos de primera línea de las cepas resistentes en estudio en 48 horas; lo cual trae un beneficio incalculable no solamente a nivel clínico sino también epidemiológico e investigativo.

El objetivo del presente trabajo monográfico es comparar los métodos bacteriológicos utilizados en el diagnóstico de la tuberculosis multidrogo-resistente en pacientes de Lima Metropolitana para implementar un método que acorte el tiempo de detección y favorezca la rapidez en la emisión del resultado considerando los resultados de las pruebas de baciloscopia, medios de cultivos y Genotype MTBDR*plus* (Genotype 1L), a partir de esputo descontaminado.

1.1. Trayectoria del autor

Julio 2016 – abril 2021

Socios en Salud Sucursal Perú

Área: Laboratorio de Micobacteriología

Puesto: Profesional de Laboratorio

Junio 2015 - junio 2016

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Área: Laboratorio de Biología Molecular

Puesto: Asistente de Investigación

Abril 2014 - mayo 2015

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Área: Laboratorio de Biología Molecular

Prácticas Pre Profesionales.

Enero - marzo 2014

Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen

Área: Laboratorio de Biomedicina Molecular Celular e Investigación

Prácticas Pre Profesionales.

1.2. Descripción de la empresa

Partners In Health (PIH) es una corporación sin fines de lucro y de caridad pública, con sus oficinas principales en Boston, Massachusetts, EE. UU. PIH está afiliada al Departamento de Salud Global y Medicina Social (DGHSM, por sus siglas en inglés) de la Escuela de Medicina de Harvard y a la División de Equidad para la Salud Global (DGHE, por sus siglas en inglés) del Hospital Brigham and Women. PIH también fundó el Instituto para la Salud y Justicia Social (IHSJ, por sus siglas en inglés) en 1993, como el brazo de investigación y educación de PIH (SES, 2019). Sus fundadores son Paul Farmer y Ophelia Dahl (ambos nacidos en Boston, EE. UU.), ellos viajaron a Haití y lograron construir una clínica comunitaria para brindar atención médica gratuita en el área más alejada y rural de Cange. Poco tiempo después, Jim Kim, Todd McCormack y Thomas J. White se sumaron a esta noble causa y al lado de Paul y Ophelia forman Partners In Health. Una organización internacional sin fines de lucro dispuesta a garantizar el derecho a la salud de toda persona a través de la justicia social empezando por aquellas que más lo necesitan (SES, 2021).

PIH está presente en 11 países (Haití, Perú, Ruanda, México, Sierra Leona, Liberia, Malawi, Lesoto, Rusia, Kazajstán, Nación Navajo) y proporciona atención directa a millones de pacientes, a través de sus programas y proyectos en alianza con los establecimientos públicos y la participación comunitaria. “Socios En Salud Sucursal Perú” (SES) es filial de la organización internacional sin fines de lucro PIH (SES, 2019).

El 08 de julio de 1996 nace Socios En Salud con la finalidad de dar respuesta a la tuberculosis multirresistente en la población de Carabayllo, considerado uno de los distritos más pobres de Lima (SES, 2021).

SES es una organización no gubernamental sin fines de lucro, con personería jurídica de derecho público interno, y autonomía económica y administrativa relacionada con PIH.

En tal sentido, SES tiene como Política básica la gerencia del logro de resultados con eficacia, eficiencia y calidad, basado en un modelo organizacional matricial flexible, que permita la integración y coordinación de todas y cada una de las funciones y actividades realizadas por sus colaboradores, con el propósito inmediato de viabilizar el logro de la Misión y Objetivos Estratégicos.

La misión de PIH es proporcionar a los pobres una opción preferencial en atención de la salud. Estableciendo relaciones de largo plazo con organizaciones hermanas establecidas en zonas de pobreza, PIH se esfuerza por lograr dos objetivos predominantes: llevar los beneficios de la medicina moderna a aquellos que más los necesitan y servir como antídoto para la desesperanza. Hacer uso de los recursos de las instituciones médicas y académicas líderes a nivel mundial y de las experiencias vividas en las comunidades más afectadas por enfermedades y más pobres del mundo. Desde su raíz, la misión es tanto médica como moral. Está basada en solidaridad, más que en caridad solamente. Cuando los pacientes están enfermos y no tienen acceso a atención, el equipo de PIH tiene profesionales en salud, académicos y activistas; quienes harán todo lo necesario para hacer que recuperen su salud, estén sanos, tal como si fuera un miembro de la familia o nosotros mismos estuviéramos enfermos.

SES es una organización dedicada a la salud, con una intervención integral y de calidad desde la opción preferencial por los pobres; para ello se establece relaciones sólidas con gobiernos e instituciones aliadas haciendo uso de los beneficios de la ciencia moderna en la lucha contra la enfermedad, la pobreza y la injusticia. Además, cuenta con el respaldo de instituciones clínicas y académicas líderes en el mundo, con experiencia de trabajo en comunidades pobres y poblaciones vulnerables con graves problemas de salud (SES, 2019).
Realiza las siguientes actividades:

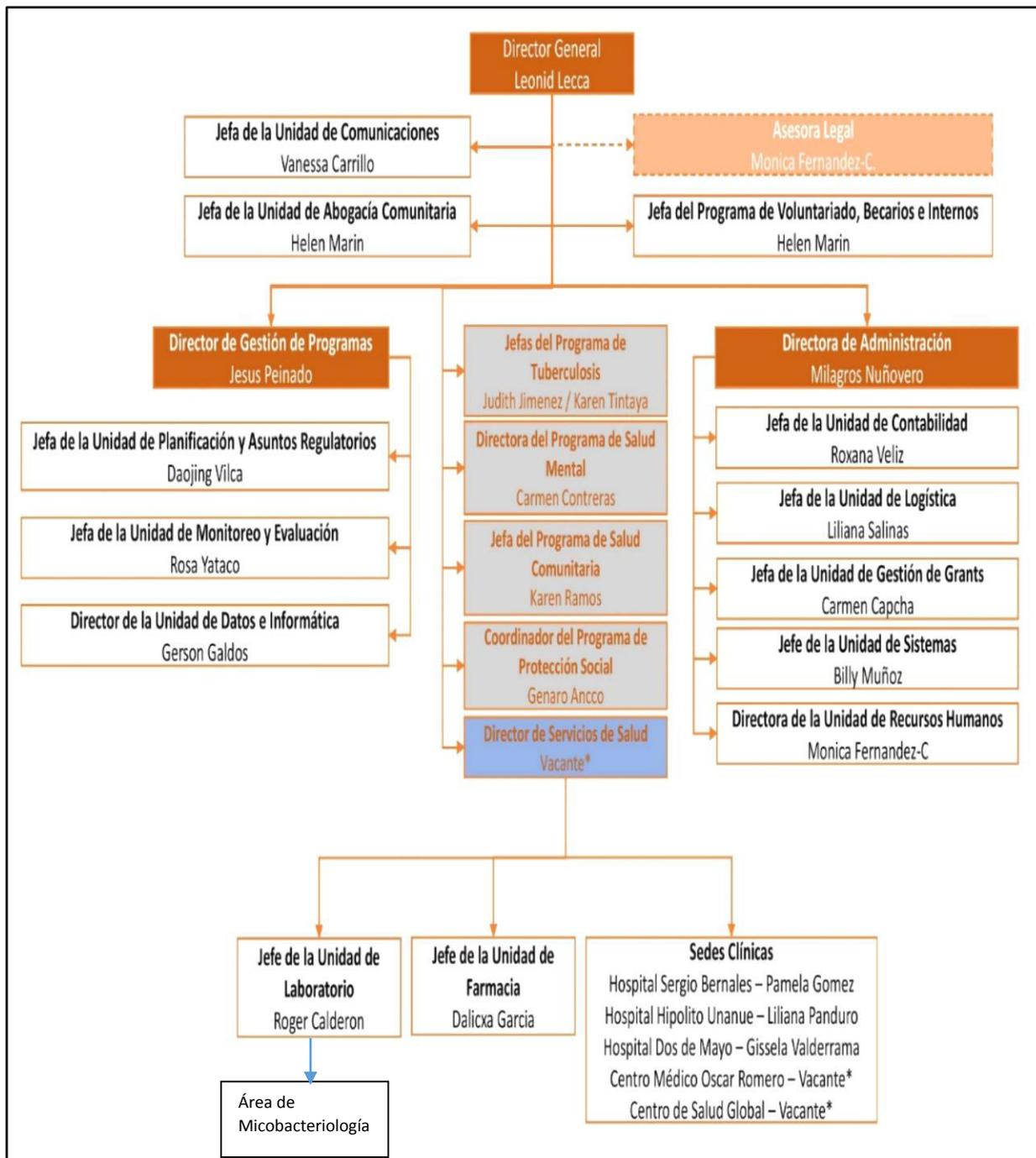
- Desde 1996, SES trabaja apoyando a los casos más complicados de tuberculosis en el país, fortaleciendo la intervención del sector de salud con métodos modernos en la detección, tratamiento, prevención e investigación.
- SES busca dar una respuesta comunitaria sostenible al problema de la atención primaria de salud mental; además promueve un enfoque comunitario especializado y no especializado para mejorar el cuidado y la adherencia.
- SES fortalece las acciones del Estado para mejorar la capacidad de respuesta de la atención primaria de salud a fin de asegurar una gestación y un parto en las mejores condiciones.
- SES a través de un modelo comunitario fortalece las habilidades del cuidador en la crianza, para explotar el vínculo positivo con el niño/a, a fin de mejorar el desarrollo infantil temprano.
- SES ofrece el acceso a espacios o servicios de salud a fin de brindar oportunamente un diagnóstico, derivación, acompañamiento en el proceso de curación y tratamiento de una enfermedad crónica.
- SES busca contribuir con la educación sexual enfocado a adolescentes a manera de prevención para evitar contraer VIH y otras ITS; además, de favorecer el acceso al tratamiento antirretroviral y mejorar la adherencia por medio del acompañamiento basado en la comunidad.
- SES da una respuesta oportuna y eficaz ante las emergencias sanitarias; por ello, establece alianzas con el sistema de salud a fin de fortalecer la atención, apoyar al sistema en la vigilancia comunitaria y la protección social, mejorar las condiciones, en equipamiento e infraestructura.

1.3. Organigrama de la Empresa

Socios en Salud Sucursal Perú tiene el siguiente organigrama:

Figura 1

Organigrama de Jefaturas



Nota: Adaptada de Socios En Salud. (SES, 2019).

1.4. Áreas y funciones desempeñadas

Área: Laboratorio de Micobacteriología - Socios en Salud

Julio 2016 – Actualidad

- Coordinación en detalle de las actividades del Laboratorio de Socios en Salud (SES-Lab) en los diferentes proyectos de investigación. Tomar responsabilidad de los acuerdos sobre los estudios y realizar el seguimiento de los puntos referidos en las reuniones, que son escritas por el profesional de laboratorio con el objetivo de cumplir con el monitoreo y actualización de dichos protocolos continuamente.
- Procesamiento microbiológico de las pruebas para el diagnóstico de tuberculosis, así como de las pruebas de susceptibilidad de *M. tuberculosis* o monitoreo del tratamiento para cada proyecto que se ejecute en el SES-Lab y la institución.
- Procesamiento molecular de las pruebas para el diagnóstico de tuberculosis, así como de las pruebas de susceptibilidad de *M. tuberculosis* o monitoreo de tratamiento para cada proyecto que se ejecute en el SES-Lab y la institución.
- Responsabilidad del aseguramiento de las condiciones necesarias para el procesamiento de muestras y la expedición de los resultados, lo que involucra a las diferentes áreas dentro y fuera de la institución.
- Registro de actividades, resultados y cumplimiento del sistema de control y garantía de calidad.
- Correcta aplicación de las buenas prácticas clínicas y de ética de investigación durante el desarrollo de los estudios en el laboratorio.
- Escritura y revisión de los diferentes procedimientos operativos estandarizados para las pruebas microbiológicas del laboratorio.
- Aseguramiento del plan de mantenimiento preventivo y correctivo anual del equipamiento del laboratorio.

- Mantener la confiabilidad de la información.
- Cumplir las normas de bioseguridad del laboratorio.

Área: Laboratorio de Biología Molecular - UPCH

Junio 2015 - junio 2016

- Estandarización de protocolo de extracción de ADN a partir de coágulo sanguíneo utilizando High Pure PCR Template Preparation kit-ROCHE para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Cuantificación de ADN mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000.
- Estandarización de Curva estándar en muestras biológicas (sangre total, coágulo sanguíneo y tejido cordón umbilical) utilizado en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Procesamiento y análisis del ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Prueba inmunológica (ELISA) para la detección cualitativa de anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano.
- Preparación de reactivos como EDTA 6M y Guanidina Tiocianato solución (6 M en 0,1 M Tris; pH 7,5) utilizados en la extracción de ADN para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Área: Laboratorio de Biología Molecular - UPCH

Abril 2014 - mayo 2015

- Extracción de ácidos nucleicos mediante método de Fenol cloroformo y usando el kit comercial QIAGEN de muestras biológicas (sangre total, coagulo sanguíneo y tejido cordón umbilical).
- Procesamiento y análisis del ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Procesamiento y análisis del ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) convencional (gel agarosa) de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.
- Procesamiento y análisis del ADN por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) convencional de *Toxoplasma gondii* para el diagnóstico de la Toxoplasmosis.

Área: Laboratorio de Biomedicina Molecular Celular e Investigación -HNGAI

EsSalud

Enero - marzo 2014

- Procesamiento y Análisis de Cargas Virales por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y Virus de la Hepatitis C (VHC) mediante GeneAmp® PCR System 9600 y GeneAmp® PCR 1400.
- Desarrollo de pruebas cualitativas para la detección por PCR del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis C (VHC) y el Citomegalovirus (CMV) mediante el sistema GeneAmp® PCR 9600 y el sistema GeneAmp® PCR 1400.
- Manejo de Citómetros de Flujo FACScalibur, FACScan y FACScout.

II. DESCRIPCIÓN DE UNA ACTIVIDAD ESPECÍFICA

2.1. Tuberculosis

2.1.1. Historia de la tuberculosis

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad antigua conocida con los nombres de: tisis, consunción, escrófula, mal de Pott, plaga blanca y mal del rey. Existen evidencias paleológicas de tuberculosis vertebral en momias egipcias que datan aproximadamente del año 2400 a.C. (González, 2014) y en restos humanos ubicados en Suecia e Italia que datan del período Neolítico (Cartes, 2013). En la antigua Grecia, la tuberculosis era conocida como tisis, fue Hipócrates (460- 377 a.C.) padre de la medicina, quien realizaría las primeras investigaciones de la tisis describiéndola como una enfermedad crónica caracterizada por tos frecuente y persistente, expectoraciones productivas, sudoración y fiebre constante, pero creía que la tuberculosis era una enfermedad hereditaria peor durante el otoño (Azizi y Bahadori, 2011).

La epidemia de TB en Europa conocida como la “plaga blanca”, se presentó en el siglo XVII y durante dos siglos mató a millones de personas, llegando a ser la primera causa de muerte en esa época. A fines del siglo XIX se logró determinar que la TB correspondía a una enfermedad infectocontagiosa causada por el agente *Mycobacterium tuberculosis*, siendo aislado el 24 de marzo de 1882 por el científico alemán Robert Koch (Araya, 2014).

La historia de la tuberculosis tuvo un giro dramático cuando Heinrich Hermann Robert Koch médico y microbiólogo alemán, presenta sus estudios a la comunidad científica de Berlín y expresa haber identificado al agente causal de la tuberculosis: un microorganismo al que denominó bacilo tuberculoso (Huapaya, 2018). En su investigación presentada Koch describe la técnica de tinción, aislamiento, cultivo del bacilo y reproducción de la enfermedad mediante la inoculación del bacilo en animales de experimentación demostrando, mediante esta secuencia experimental, que este organismo era el ente causante de la TB (Barnes, 2000). Este

hecho histórico sería esencial en la lucha antituberculosa siendo el sustento para el desarrollo de métodos diagnósticos y la búsqueda de un tratamiento eficaz contra la enfermedad.

En el siglo XIX se creía que el aire fresco y una adecuada alimentación tenían un efecto terapéutico sobre los pacientes tuberculosos. Basada en esta teoría se crean el primer sanatorio en la región montañosa de Silesia (Alemania) y luego en muchas partes del mundo. Con el desarrollo de los primeros antibióticos efectivos contra la tuberculosis, después de la Segunda Guerra Mundial, fue posible medicar a los pacientes y recuperarse en sus propios hogares. Esta situación debilitó en gran medida la importancia de los diversos sanatorios y motivó sus cierres (Bunyan, 1993).

En 1921 Camille Guérin, culmina la preparación de la nueva vacuna antituberculosa, que lleva el nombre de vacuna BCG (Bacilo de-Guerin), la que es aplicada por primera vez en el ser humano por Weill-Halle y aún se utiliza. La introducción de la vacuna BCG ha salvado millones de vidas durante todos estos años, al prevenir las formas graves de tuberculosis que tanta muerte y secuelas producía entre la población infantil y juvenil (Pérez et al., 2009).

Con el estudio realizado a hongos y bacterias a principios del siglo XX, en 1942 Waksman, Dubos y Shatz, descubren las propiedades antibacterianas de un hongo del suelo, el *Streptomyces griseus* sobre el crecimiento del *Mycobacterium tuberculosis*. Así, en 1944 se trata por vez primera a un enfermo de TB con extracto del hongo (estreptomina) consiguiendo su recuperación (Feldman y Hinshaw, 1944).

Desde entonces se inicia la monoterapia de estreptomina y comienzan a surgir cepas resistentes, pero prontamente se descubrió que se podía evitar con el uso de dos o más fármacos antiTB, el ácido paraaminosalicílico (PAS) que fue desarrollado por Jorgen Lehman en 1945, basado en el conocido principio de inhibición competitiva de sustratos (Lehmann, 1964). En 1952, Hoffman descubre la Isoniacida o Hidracida del ácido isonicotínico sintetizada a partir de la nicotinamida y de la tiosemicarbazona (McDermott, 1969), esta prodroga mostró ser más

potente que la estreptomicina y PAS, pirazinamida (1954), cycloserina (1955), etambutol (1962) y en 1968, el grupo italiano de P. Sensi logra el aislamiento de la Rifampicina, un derivado semisintético de la Rifamicina. La introducción de este potente medicamento en los esquemas antituberculosos permitió disminuir de forma notable la duración de la quimioterapia (Pérez et al., 2009).

Con el descubrimiento de los antibióticos, se establecen las bases de la quimioterapia moderna (tratamientos asociados y prolongados). Junto a ello se aplican programas de control a nivel nacional, medidas para evitar la transmisión intrahospitalaria y la aplicación de la vacuna BCG, que previene las formas más graves de la TB en niños. Desde ese momento, cambia el curso y pronóstico de este mal, iniciándose un descenso significativo de su incidencia y mortalidad hasta mediados de los años 80 (Araya, 2014).

2.2. Definición

La TB es una enfermedad infectocontagiosa, prevenible, curable y con un importante componente social (Wingfield et al., 2016), producida por el bacilo del género *Mycobacterium* existiendo 4 cepas capaces de producir la enfermedad: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*, siendo el *M. tuberculosis* el más frecuente. El bacilo afecta principalmente los pulmones, pero también puede atacar otros órganos, como el cerebro, la columna vertebral, etc., adquiriendo en esos casos el nombre de Tuberculosis extra-pulmonar (Bermejo et al., 2007).

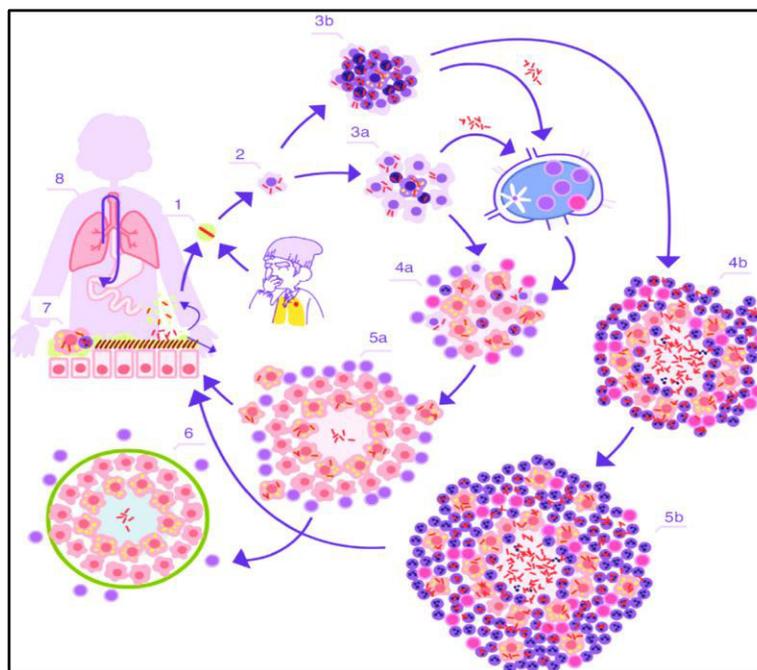
2.3. Mecanismo de transmisión

El mecanismo habitual de transmisión es por vía aérea a través de las gotas aerosolizadas de 1-5 micras de diámetro conocido como aerosoles que son producidas por el paciente enfermo al hablar, reír y muy especialmente al toser. Las partículas grandes quedan atrapadas en la superficie de la mucosa y son eliminadas por la acción de los cilios del árbol respiratorio. Sin embargo, las partículas pequeñas que contienen pocos bacilos (entre 1 y 5 en

cada gotita) son las que llegan al alvéolo, lugar donde encuentran las condiciones idóneas para su desarrollo (Murray et al., 2010). Las defensas locales acudirán a la zona y en la gran mayoría de casos controlarán la infección, pero en otros no lo podrán hacer, produciéndose entonces una tuberculosis primaria. (Figura 2) Aunque la vía aérea de transmisión es la más común, existe la vía digestiva, que es a través del consumo de leche no pasteurizada de animales infectados por el *M. bovis*. Se describe también, aunque de manera infrecuente, la transmisión por las vías urogenital, cutáneo-mucosa, transplacentaria (tuberculosis congénita) y por inóculo (Bermejo et al., 2007).

Figura 2

Ciclo infeccioso de Mycobacterium tuberculosis



Nota: (1) Entrada de bacilos al alvéolo pulmonar a través de una gota de aerosol. (2) Fagocitosis por parte de un macrófago alveolar (MA) y posterior multiplicación en su interior. (3) Destrucción del MA, diseminación local de *M. tuberculosis*, fagocitosis por parte de otros MA y generación de una respuesta inflamatoria local dominado por monocitos (3a) o entrada de células polimorfonucleares (PMN) (3b), merced a la cual los bacilos pueden ser drenados hacia el ganglio linfático regional, donde proliferan linfocitos Th1 o Th17. (4) Los linfocitos son atraídos por la respuesta inflamatoria de las lesiones y activan a los MA infectados o atraen

más PMN, dependiendo de que la respuesta inmune se decante por una respuesta de tipo Th1 (4a) o Th17 (4b), respectivamente. En el primer caso hay un control de la población bacilar y hay un drenaje de bacilos adormecidos a través de los macrófagos espumosos (5a), hasta que se controla mediante la encapsulación de la lesión (6). En el segundo, las lesiones van creciendo de tamaño gracias a la entrada de PMN y el crecimiento bacilar extracelular en las trampas extracelulares de neutrófilos (NET), generando nuevas lesiones periféricas. En este caso, la concentración bacilar es mucho más alta, y de aquí que el drenaje sea mucho más importante, ya sea a través del fluido alveolar o a nivel sistémico mediante la neovascularización del granuloma (5b). A nivel pulmonar los bacilos del fluido alveolar (7) tienden a ser drenados hacia el tracto gastrointestinal (8), aunque pueden formar parte de nuevos aerosoles, generando nuevas lesiones (1). Adaptada de Cardona (Cardona, 2017).

Los pacientes con más probabilidad de contagiar son aquellos en cuyo esputo contiene numerosas formas bacilares, tos intensa, ausencia de protección con mascarilla o sin tratamiento tuberculostático en los 15 primeros días del paciente. La exposición de estos enfermos y en condiciones inadecuadas de la vivienda (habitación mal ventilada), son factores importantes que influyen en el riesgo de infección (Bermejo *et al.*, 2007).

Respecto a la proliferación o la epidemia tuberculosa, cada enfermo bacilífero debe infectar al menos a 20 personas, pues de estos 20 infectados, sólo el 10%, es decir dos, desarrollarán la enfermedad y sólo uno de ellos será un ente contagioso (bacilífero) manteniendo la transmisión de la enfermedad. Si un enfermo infecta menos de 20 pacientes, se produce un declive natural de la enfermedad (Bermejo *et al.*, 2007).

Una vez se produce la infección pueden evolucionar de las siguientes maneras:

- La infección se resuelva por sí misma a través de los macrófagos
- Dentro de las siguientes semanas o meses se desarrolle una tuberculosis activa
- Que la infección se mantenga asintomática por un largo tiempo (latente), y se active en cualquier momento por la deficiencia del sistema inmune, ya sea por la edad o consecuencia de otras enfermedades, especialmente VIH (Van Crevel *et al.*, 2002).

Una vez se desarrollen sus manifestaciones clínicas, que se caracterizan normalmente por síntomas como: sudoración nocturna (diaforesis), pérdida de peso inexplicable, tos con expectoración por más de 15 días, siendo estos algunos de los principales síntomas. En algunos casos no se presentan los anteriores síntomas y estos van a depender del foco o localización de la infección y del sistema inmune del hospedero (Schluger y Rom, 1998).

2.4. Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que la TB sigue siendo el principal asesino infeccioso en todo el mundo, 10 millones de personas enfermaron de TB en 2018, además 7 millones de personas recibieron atención de calidad para la TB en 2018 y las muertes relacionadas con la TB disminuyeron de 1,6 millones en 2017 a 1,5 millones en 2018 por lo que el *Mycobacterium tuberculosis* se ha convertido en el agente infeccioso que más muertes ocasiona, por encima del VIH y la malaria (WHO, 2016). Geográficamente, la mayoría de los casos de TB en 2018 fueron en Regiones de la OMS del Sudeste Asiático (44%), África (24%) y el Pacífico occidental (18%), con porcentajes menores en el Mediterráneo Oriental (8%), las Américas (3%) y Europa (3%). Ocho países representaron dos tercios del total global: India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (6%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%). Estos y otros 22 países en la lista de la OMS de 30 países con alta carga de TB representaron el 87% de los casos del mundo. La tuberculosis farmacorresistente sigue siendo una amenaza a la salud pública (WHO, 2019). La OMS estima que hubo 484 000 nuevos casos de TB resistente a la rifampicina (de los cuales el 78% tenía tuberculosis multirresistente). Los tres países con la mayor proporción de la carga global fueron India (27%), China (14%) y Federación de Rusia (9%). A nivel mundial, el 3,4% de los nuevos casos de TB y el 18% de los casos tratados previamente tenían resistencia a múltiples fármacos TB o TB resistente a la rifampicina (MDR / RR-TB), con las proporciones más altas (> 50% en los tratados previamente casos) en países de la antigua Unión Soviética (WHO, 2019).

Como respuesta global a la epidemia de la TB, la OMS ha elaborado la estrategia "Fin de la Tuberculosis" cuyas metas al 2035, con respecto al año 2015, son: a) reducir en un 95% de muertes por TB; b) reducir la tasa de incidencia de TB en un 90% (lograr una tasa < 10 casos por cada 100 mil habitantes), y c) lograr cero familias afectadas por costos catastróficos por TB (se refiere al pago directo por el usuario de gastos médicos y no médicos y costos indirectos que excedan un umbral dado de la renta del hogar, por ejemplo, el 20%) (OMS, 2016). Los tres pilares para el logro de las metas de la estrategia "Fin de la Tuberculosis", son: Pilar 1: Prevención y atención integral de la TB centrada en el paciente; Pilar 2: Políticas audaces y sistemas de soporte, y Pilar 3: Investigación e innovación intensificada (WHO, 2015 y Uplekar, 2015).

En el Perú, la Ley 30287, Ley de Control y Prevención de la Tuberculosis en el Perú 2015 y su Reglamento (Decreto Supremo 021-2016), declara de interés nacional la lucha contra la TB en el país, logrando, de esta forma, que el control de la TB sea una política de Estado, independiente a los gobiernos de turno. Las personas afectadas por TB en el Perú son diagnosticadas y tratadas de manera gratuita por las instituciones del sistema de salud del país: el 73% se atienden en el MINSA, el 19% en la Seguridad Social (ESSALUD), el 7% en el Instituto Nacional Penitenciario (INPE) y el 1% en las Sanidades de la Policía Nacional y las Fuerzas Armadas. La atención privada de la TB es limitada, dada la prohibición de la venta libre de medicamentos anti-TB en el Perú. Los pacientes diagnosticados en el sector privado son atendidos en coordinación con EsSalud y el MINSA, tanto las formas sensibles como las resistentes de TB (Alarcón et al., 2017)

En el Perú en un reporte preliminar de la Dirección de Prevención y Control de TB (DPCTB) menciona que la carga de tuberculosis en el año 2018 fue de 31 668 casos, presentándose casos nuevos un total 27 575 y con tuberculosis pulmonar frotis positivo fueron 15 361, TB-MDR: 1593 y TB-XDR: 98 casos; también indican que el 61 % (19 242) de casos

de TB fueron notificados en Lima y Callao, a la vez mencionan que doce regiones son priorizadas por presentar la incidencia de TB en alto y muy alto riesgo (Lima, Callao, Ica, Madre de Dios, Ucayali, Loreto, Tacna, Moquegua, La Libertad, Lambayeque, Ancash y Arequipa) (Ríos, 2018).

A la vez el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de enfermedades entre los años 2013 al 2018, notifico al sistema de vigilancia de TB (SiEpi TB) un total de 1 709 casos de TB en trabajadores de salud, el 72,3 %, se diagnosticaron con TB pulmonar con confirmación bacteriológica y casi la mitad de estos casos fueron diagnosticados con carga bacilar alta (2+ y 3+) (Flores, 2018).

2.5. La tuberculosis multidrogo-resistente (TB-MDR) y la tuberculosis extensamente resistente (TB-XDR)

La TB-MDR es la causada por una cepa que no responde al tratamiento con isoniazida y rifampicina, los dos fármacos antituberculosos más potentes, no son eficaces. La forma multirresistente se puede tratar y curar con medicamentos de segunda línea. Ahora bien, las opciones de tratamiento de segunda línea son limitadas y requieren quimioterapia de larga duración (hasta dos años de tratamiento) con fármacos que además de caros son tóxicos. En algunos casos, se pueden alcanzar grados aún más preocupantes de farmacorresistencia.

La TB-XDR es una forma más grave de tuberculosis multirresistente causada por bacterias que no responden a los medicamentos antituberculosos de segunda línea más eficaces, lo que deja a muchos pacientes sin otras opciones de tratamiento (Araya, 2014).

La resistencia a antimicrobianos emerge como resultado de un tratamiento inadecuado, una vez que el organismo de la TB adquiere la resistencia, ellos pueden diseminarse entre personas de la misma manera que lo hacía antes (WHO, 2012).

2.5.1. Evaluación de la resistencia microbiana

Se evalúa la resistencia bajo dos definiciones que se relacionan a la existencia o no de tratamientos previos. (Farga y Caminero, 2012):

- Resistencia primaria: Se define como el aislamiento de *M. tuberculosis* resistente en pacientes que no han recibido tratamiento antituberculoso previo, o éste fue inferior a 1 mes. Este concepto se utiliza para evaluar la transmisión reciente por una infección primaria de una cepa resistente.
- Resistencia adquirida: Se trata del aislamiento de *M. tuberculosis* resistente en pacientes que han recibido tratamiento antituberculoso previo durante, al menos, 1 mes. Se debe a una incorrecta administración de la quimioterapia.

La TB resistente a los fármacos se produce en el curso de tratamientos inadecuados que facilitan la aparición de bacilos con mutaciones cromosómicas que les confieren dicha resistencia. Este hecho suele derivarse por:

- La administración de fórmulas de medicamentos ineficaces (uso de un solo fármaco, medicamentos de baja calidad o mal almacenados).
- Una mala adherencia al tratamiento.
- Prescripciones erróneas de los facultativos (no se respetan los esquemas normados de tratamiento, quimioterapias incompletas).
- Problemas de absorción intestinal (p. ej. administración con alimentos e infección por el VIH).
- Programas de control inadecuados en instituciones de riesgo.
- Así como de otros factores derivados de la pobreza, como es la falta de acceso a los medicamentos o el mal estado de éstos.

- La interrupción temprana del tratamiento puede causar resistencia a los medicamentos que puede desarrollarse. luego transmitirse especialmente en lugares con una gran cantidad de personas, como prisiones u hospitales (Alcaide y Santín, 2008).

2.6. Tratamiento de la Tuberculosis

Es primordial que los pacientes con TB reciban un tratamiento adecuado, y así terminen por completo sus medicamentos y los ingieran exactamente como les indica su médico especialista. El hecho de no tomar sus medicinas como se le indica sería perjudicial para ellos y volverían a enfermar o peor que la enfermedad sea más grave y conlleve a resistencia de fármacos, al respecto la tuberculosis resistente a medicamentos antituberculoso es difícil y más costosa de tratar y en el Perú es preocupación del Ministerio de Salud que lo considera un desafío económico a tratar y solucionar (MINSA-DGE, 2013).

La TB común tratada con los medicamentos del esquema básicos se supera en seis meses aproximadamente según la OMS. Los medicamentos que componen este esquema básico de tratamiento según Caminero, 2015, incluyen a la Isoniazida (INH), Rifampicina (RIF), Etambutol (EMB), Pirazinamida (PZA).

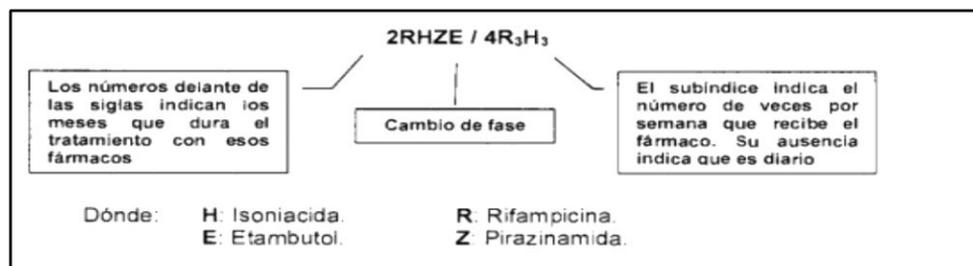
Así mismo cada persona diagnosticada de tuberculosis debe recibir una atención integral del establecimiento de salud donde le corresponda durante todo el tratamiento; esa atención integral consiste en atención médica, atención por enfermería, psicología, asistencia social, evaluación nutricional, salud sexual y reproductiva, y exámenes auxiliares basales, es decir una atención multidisciplinaria (Ríos, 2018). Los esquemas de tratamiento en el Perú por parte del MINSA/DGSP son de su responsabilidad y debe ser cumplido de lunes a sábado, incluyendo los feriados.

Si el paciente responde al tratamiento con INH y RIF entonces se sigue el esquema básico, el que consiste en dos meses de tratamiento con INH, RIF, EMB y PZA de forma diaria

con 60 tomas, con lo que se termina la primera fase, la siguiente fase será de 4 meses de tratamiento con INH y RIF Inter diario. En la Figura 3 se explica la nomenclatura usada.

Figura 3

Esquema para el tratamiento de la TB común



Si el paciente presenta resistencia a alguno o a ambos medicamentos (INH o RIF), se deberá agregar al esquema básico algún tipo de agente inyectable de segunda línea como lo es la Kanamicina, Amikacina, Capreomicina y alguna fluoroquinolona como levofloxacina o Moxifloxacina; o algún agente de segunda línea bacteriostático oral como la Etionamida o Cicloserina (Golpe et al., 2002). En casos determinados el tratamiento será individualizado debido a la resistencia que podría tener a determinados fármacos o a alguna reacción adversa que presente (SNTC, 2009).

2.7. Métodos bacteriológicos para el diagnóstico de TB

El trabajo que se presenta se centra en el diagnóstico de TB-MDR en la sede de Carabayllo, ciudad de Lima en el año 2018. Las siguientes líneas explican el proceso por medio del cual se determina en cada caso si las muestras son positivas o negativas, así también de manera resumida se presenta un flujograma que ilustra el procedimiento desde que llega la muestra hasta la elaboración del diagnóstico (Figura 4).

SES cuenta con un laboratorio de Bioseguridad Nivel 3 (BSL-3), que permite el manejo de agentes biológicos que causan enfermedades infecciosas potencialmente letales para el ser humano.

El BSL-3 está aislado de las áreas comunes al personal por medio de un vestíbulo llamado precámara es una zona de acceso controlado a través de un mínimo de dos puertas, destinado a mantener la diferencia de presiones entre el laboratorio y el espacio adyacente, dicha zona de acceso funciona como vestidor. Las dobles puertas de acceso al laboratorio cuentan con cierre automático y disponen de un mecanismo de interbloqueo, de modo que sólo una de ellas esté abierta al mismo tiempo.

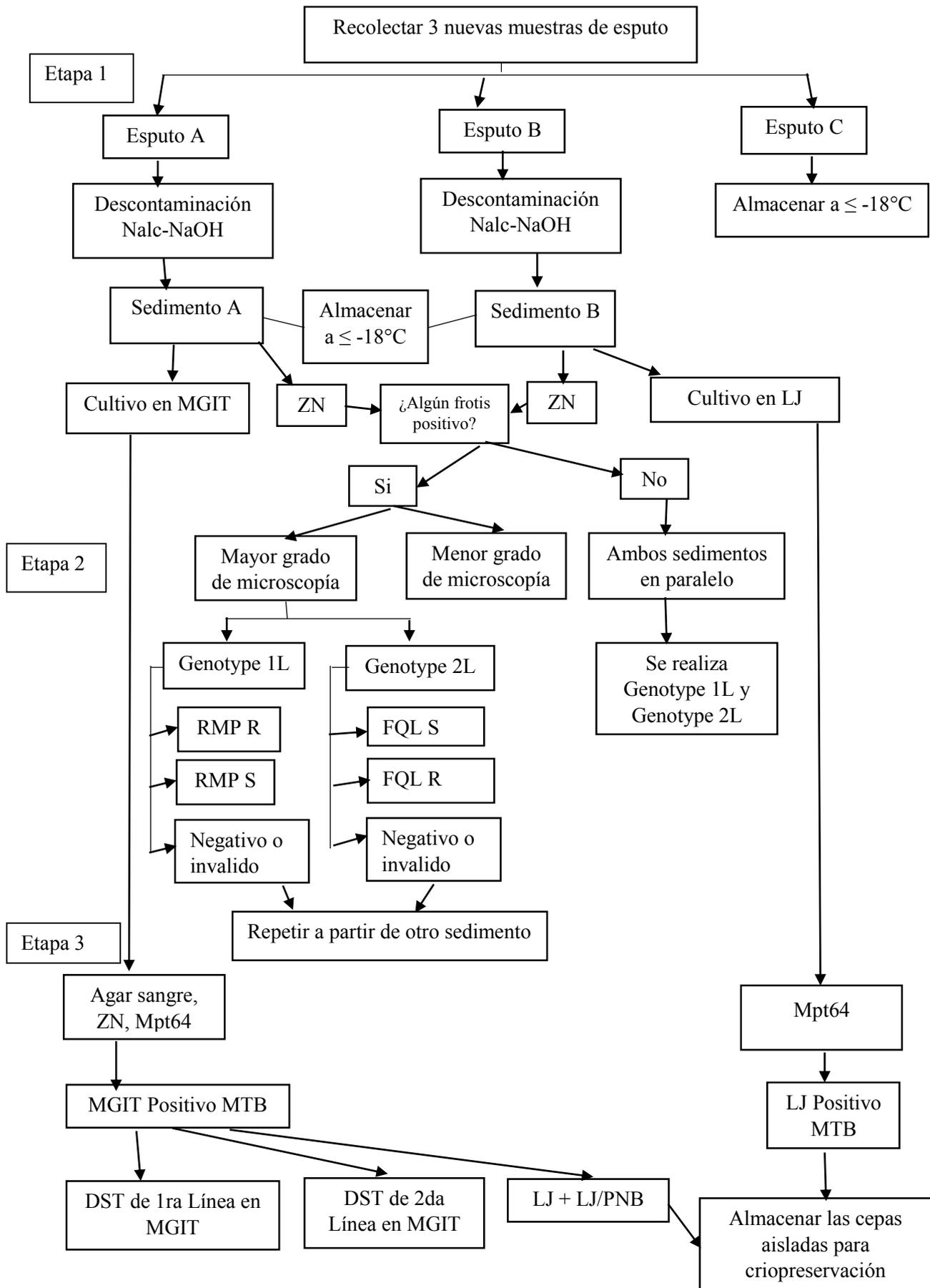
El BSL-3, cuenta con un ambiente de trabajo y cumple con los requerimientos en materia de Bioseguridad, por esta razón cuenta con flujo de aire unidireccional hacia adentro y con un dispositivo de vigilancia visual, con o sin alarma, esto se logra manteniendo depresiones barométricas dentro del laboratorio y del vestidor, que pueden ser verificadas mediante manómetros, posee también diferencia de presión de 25Pa entre suministro y extracción de aire y presión diferencial negativa (12.5Pa) entre las diferentes áreas de contención, además cuenta con un sistema de alarma contra incendio, control de acceso y salida de emergencia. En el sistema de extracción del cuarto al interior del área contenida se cuenta con filtro de aire HEPA (del inglés "High Efficiency Particle Arresting", o "recogedor de partículas de alta eficiencia") para garantizar la captación de cualquier agente patógeno hacia el exterior (Rivera et al., 2018).

Las etapas que comprende el proceso general de diagnóstico que sigue el proyecto “Fin de la Tuberculosis etapa 2” se muestran en la figura 4 y estas son:

1. Proceso de descontaminación de muestras respiratorias por el método Nalc-NaOH.
2. Procesamiento de Genotype MTBDR*plus* y Genotype MTBDR*sl*.
3. Prueba de susceptibilidad de resistencia a antibióticos de 1ra y 2da línea.

Figura 4

Flujograma de muestras de tamizaje del proyecto “Fin de la tuberculosis etapa 2



Nota: Este flujograma se divide en tres etapas. La etapa 1: Proceso de descontaminación de muestras respiratorias por el método Nalc-NaOH. Etapa 2: Procesamiento de Genotype MTBDR*plus* y Genotype MTBDR*sl*. Etapa 3: Prueba de susceptibilidad de drogas antituberculosas de 1ra y 2da línea. Donde: Nalc-NaOH es N-acetil-L-Cisteína- Hidróxido de sodio, MGIT es el tubo indicador de crecimiento de la Micobacteria, ZN es la técnica de coloración Zielh Neelsen, LJ es Löwenstein-Jensen, RMP R es rifampicina resistente, RMP S es rifampicina sensible, FQL S es fluoroquinolonas sensibles, FQL R es fluoroquinolonas resistentes, el antígeno Mpt64 es una proteína específica del complejo *M. tuberculosis*, DST por sus siglas en inglés drug-susceptibility testing es la prueba de susceptibilidad a drogas anti-TB y LJ/PNB es el LJ que contiene el ácido paranitrobenzoico utilizado para la identificación de otras micobacterias (SES, 2019).

A continuación, se detalla cada una de ellas:

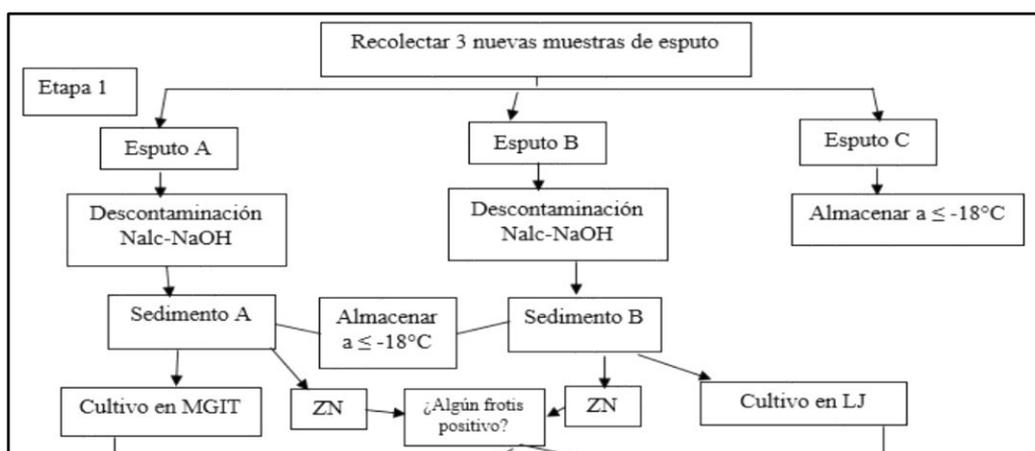
2.7.1. Descontaminación de muestras respiratorias por el método NALC-NaOH

Todos los integrantes del complejo *M. tuberculosis*, y varias micobacterias ambientales proliferan muy lentamente. En cambio, la flora habitual de las secreciones del aparato respiratorio que han atravesado las vías altas, las muestras del tracto digestivo y de las lesiones superficiales de piel, todas estas se multiplican cada 15-60 minutos; por ende, no es posible aislar al bacilo de la tuberculosis inoculando estas muestras directamente en placas con medios de cultivo y seleccionando colonias por su morfología; debido a que la gran velocidad de crecimiento de las otras bacterias (contaminantes) pone en riesgo el aislamiento micobacteriano. Por ello, es necesario homogeneizar las muestras respiratorias densas, como los esputos, y eliminar la flora acompañante del aparato respiratorio mediante un proceso de descontaminación. Esto es realizado generalmente con una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH). Es recomendable agregar N-acetil-L-Cisteína (NALC) como agente mucolítico utilizado para disminuir la viscosidad del esputo y favorecer la penetración del descontaminante (NaOH), que puede entonces ser utilizado en menor concentración y durante menos tiempo para evitar el deterioro de las micobacterias que serán aisladas. El uso del buffer

fosfato facilita la precipitación de los bacilos por centrifugación (OPS, 2008). En la etapa 1 se muestra el proceso que sigue el esputo crudo al ser procesado para obtener al final un sedimento, el que se siembra en los medios de cultivo (MGIT y LJ), el crecimiento en estos medios permite identificar a *M. tuberculosis*. Además del sedimento se realiza una baciloscopia, también es utilizado para la extracción de ADN y almacenamiento del sedimento a -80°C . La Figura 5 explica este procedimiento.

Figura 5

Flujograma del proceso de descontaminación de muestras respiratorias por el método Nalc-NaOH



Nota: Donde Nalc-NaOH es N-acetil-L-Cisteína- Hidróxido de sodio, MGIT es el medio de cultivo líquido conocido por sus siglas en inglés de Mycobacteria Growth Indicator Tube como MGIT que es el tubo indicador de Crecimiento de la Micobacteria, la coloración se realiza por la técnica Zielh Neelsen (ZN) y LJ es el medio de cultivo sólido Löwenstein-Jensen.

2.7.1.1. Procesamiento de muestras paso a paso

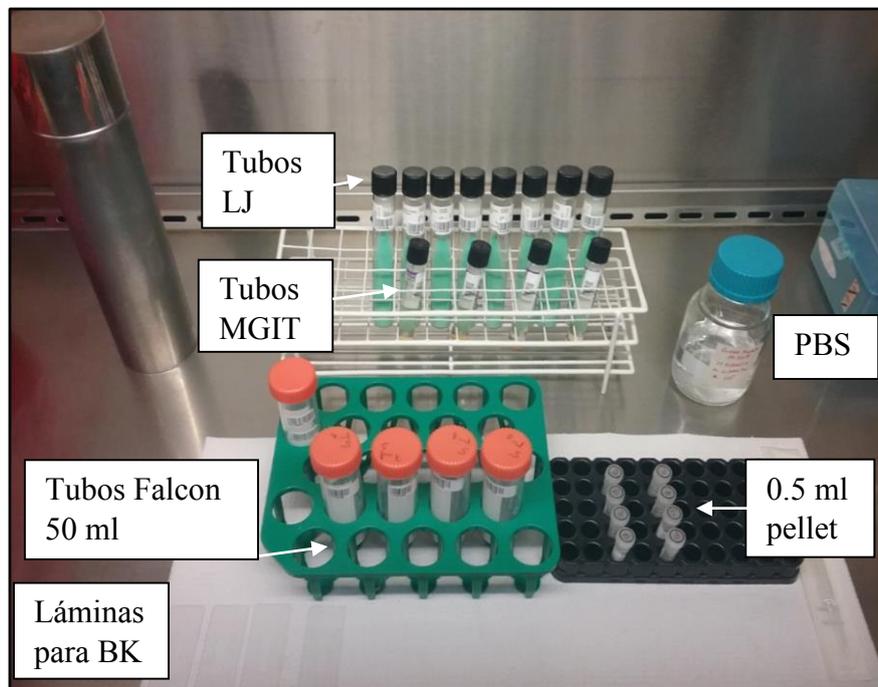
- Utilizando las muestras de esputo A y B se trabaja en una Cabina de Bioseguridad IIA (CBS), utilizando el equipo de protección personal obligatoriamente.
- Trabajar sobre papel absorbente con base plastificada impermeable (Tipo Versi-Dry®) empapado con Vesphene® 5% (micobactericida).

- c. Rotular el material necesario con ayuda de etiquetas Dymo Labelwriter 450 (pertenece a la categoría de impresora térmica), empleando el código de muestra (ID) correspondiente a cada paciente.
- d. Se verifica y se registra la calidad y el volumen de la(s) muestra(s) en el sistema de registro correspondiente.
- e. Se transfiere todo el contenido del esputo de las muestras A y B a dos tubos cónicos de 50 ml Corning™ Falcon™ respectivamente.
- f. Antes de iniciar con el proceso de descontaminación es necesario añadir 0.1 g de NALC a cada 20 ml de solución descontaminante (NaOH-Citrato de Sodio al 4%) y diluirlo con suaves movimientos para evitar hacer burbujas (que indiquen oxidación del NALC), ya que, esto podría reducir la actividad mucolítica del reactivo.
- g. Añadir la solución descontaminante a ambas muestras de esputo, en una proporción 1:1 con el volumen de la muestra.
- h. Cerrar el tubo Falcon y homogenizar mediante vórtex durante 15 segundos.
- i. Invertir el tubo Falcon 5 veces para asegurar que la solución descontaminante esté en contacto con toda la superficie interior del tubo, incluyendo la tapa.
- j. Incubar por 20 minutos como máximo a temperatura del ambiente (la que debe mantenerse entre 18°C a 25°C).
- k. Finalizado el período de incubación neutralizar la reacción añadiendo PBS (Buffer Fosfato Salino) hasta completar 50 ml (utilizando una probeta estéril de 100 ml).
- l. Ajustar las tapas de los tubos y homogenizar con ayuda del vórtex.
- m. Los contenedores donde se colocan los tubos falcón son llevados dentro de la CBS y en estos contenedores se colocan los tubos falcón (de forma balanceada). Cerrar herméticamente las tapas de estos contenedores para ser llevados a la centrifuga refrigerada a 4°C.

- n. Centrifugar a 3000 g durante 20 minutos.
- o. Luego de la centrifugación, retirar los recipientes herméticamente cerrados de la centrífuga y abrirlos dentro de la CBS; retirar los tubos con muestras. Esperar 5 minutos antes de abrir la(s) tapa(s) de los tubos con muestra.
- p. Decantar la totalidad del sobrenadante de cada tubo conteniendo la muestra descontaminada, en los contenedores de descarte de metal que contengan Vesphene® 5%.
- q. Se resuspende el sedimento de cada muestra de los esputos A y B descontaminadas y completadas a un volumen final de 2 ml de PBS estéril. Utilizar inmediatamente el sedimento resuspendido (pellet) para las siguientes opciones de acuerdo con los requerimientos de cada protocolo del estudio. De modo que la muestra A es sembrada en medios de cultivo MIGIT líquido y la muestra B en medio sólido LJ (Figura 6).
- Del volumen de la muestra A resuspendida a 2 ml se toma 0.5 ml de para ser sembrada en un medio de cultivo MGIT (medio indicador para el crecimiento de micobacterias).
 - De la muestra B se toman 0.2 ml de la resuspensión para ser sembrados en dos tubos paralelos de cultivo sólido Löwenstein-Jensen (LJ).
 - Por otro lado, para realizar la coloración Zielh Neelsen de ambas muestras se toma 0.1 ml de cada una y se sigue el protocolo de tinción.
 - De ambas muestras se almacena 1 ml de pellet resuspendido a -80°C. (en caso se necesitará repetir alguno de los ensayos).
 - Para el procesamiento de la muestra por medio de técnicas moleculares se separa 0.5 ml de este pellet suspendido para extracción de ADN usando dos Kits comerciales de la empresa Genotype: *MTBDRplus* para la identificación de resistencia a Rifampicina e Isoniacida y Genotype *MTBDRsl* para la identificación de resistencia a Fluoroquinolonas y Aminoglucósidos

Figura 6

Materiales utilizados en el proceso de resuspensión del sedimento después de la descontaminación de las muestras A y B



Nota: Donde BK: Baciloscopía, LJ: Löwenstein-Jensen, MGIT: Tubo Indicador de Crecimiento de Micobacteria, PBS: Buffer fosfato salino y Pellet: Sedimento resuspendido proveniente de la descontaminación del esputo.

2.7.2. *Baciloscopía (BK) mediante tinción Ziehl Neelsen*

La tinción de Ziehl Neelsen (ZN), es una técnica de coloración de microorganismos para la identificación de patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* causante de la tuberculosis, que requiere de tres soluciones: Carbol Fucsina Fenicada (Fucsina Fenicada) al 1%, Solución Decolorante al 3% y Azul de Metileno al 0.1%.

La tinción ZN se fundamenta en la estructura de las paredes celulares de las micobacterias que contienen lípidos y otros ácidos grasos (ácidos micólicos) de elevado peso molecular, que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos calientes, por lo que se denominan bacterias ácido-resistentes o ácido-alcohol resistentes. La tinción se basa en colocar fucsina fenicada y calentar

la preparación ligeramente para solubilizar las ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular para que permita el paso libre del colorante, el cual tiene una enorme afinidad por los ácidos micólicos presentes en la pared. Al enfriar con agua, los componentes de la pared vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol-ácido, donde el azul de metileno se utiliza como contratinción (Tankeshwar, 2013). Para que la baciloscopía sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo, entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra. Este alto contenido de bacilos se encuentra en los pacientes con tuberculosis pulmonar, especialmente en aquellos con enfermedad avanzada y con lesiones cavitadas (Asencios et al., 2005).

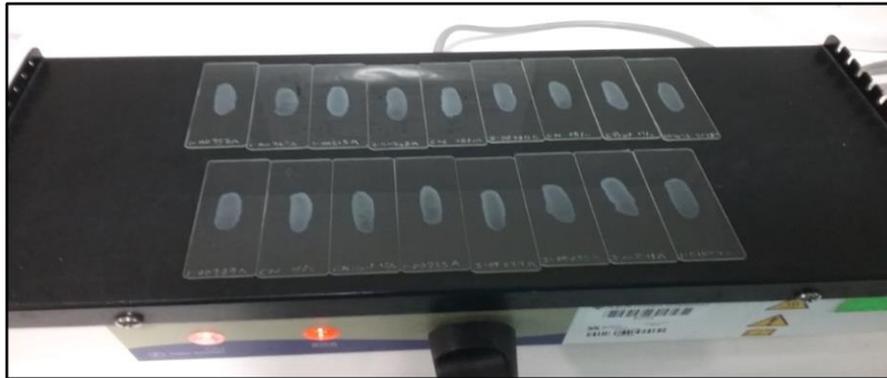
2.7.2.1. Extendidos y fijación de muestras para la baciloscopía

- a. Trabajar en la CBS, utilizando el equipo de protección personal obligatoriamente.
- b. Trabajar sobre papel absorbente con base plastificada impermeable (Tipo Versi-Dry®) y empaparlo con Vesphene® 5%.
- c. Usar solamente láminas portaobjetos nuevas. Retirar la grasa de las láminas, limpiándolas con papel toalla empapado de alcohol de 70°.
- d. En un extremo de la lámina rotular el código o ID de la muestra usando un lápiz con punta de diamante.
- e. Para realizar una baciloscopía concentrada, dispensar una gota (0.1ml) del sedimento resuspendido de la muestra descontaminada proveniente del esputo A y usar otra lámina para el esputo B con pipeta de transferencia estéril y colocar en la lámina que corresponda. Se extiende enteramente el volumen agregado usando la pipeta de transferencia estéril en un área circular y en el centro de la lámina.
- f. Dejar secar la lámina en el secador de láminas (70°C), por 30 minutos como mínimo con lo cual se conseguirá la fijación de la muestra sobre la lámina (Figura 7).

g. Dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiental antes de iniciar la coloración.

Figura 7

Secado de láminas a 70°C



2.7.2.2. Tinción de extendidos de muestras

a. Colocar las láminas con las muestras respiratorias en un soporte de metal de tinción de láminas con la muestra hacia arriba. Se mantiene separadas una lámina de otra para evitar la mezcla de los fluidos de las láminas.

b. Dispensar sobre ellas la solución de fucsina fenicada 1% previamente filtrada; cubriéndolas por completo.

c. Calentar cada lámina suavemente, usando para ello un mechero de alcohol por debajo de cada una de ellas, mediante movimientos de vaivén horizontal hasta que aparezca un ligero vapor en cada lámina (Figura 8).

d. Repita este procedimiento 3 veces evitando que el colorante entre en ebullición.

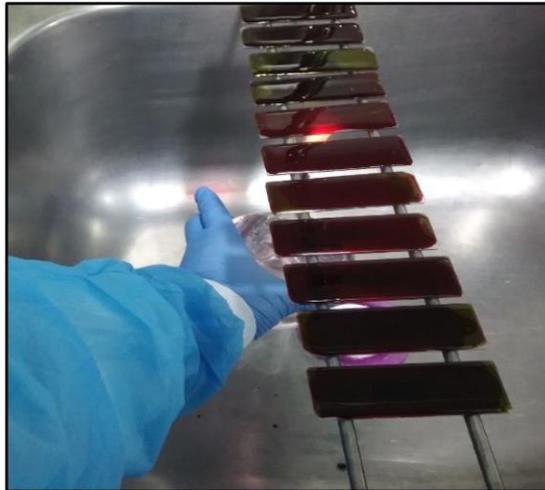
e. Mantener las láminas con el colorante por 10 minutos.

f. Eliminar la solución de fucsina fénica enjuagando con agua suavemente con la ayuda de un vaso precipitado; desde un extremo de la lámina en donde no se encuentre el extendido, durante 5 segundos o hasta eliminar el colorante.

- g. Luego, escurra las láminas y colóquelas nuevamente en soporte de tinción y cubra las láminas con la solución de alcohol-ácido 3%.
- h. Mantenga las láminas con la solución decolorante (alcohol-ácido) por 3 minutos.
- i. Elimine el alcohol ácido y enjuague las láminas con agua suavemente con ayuda de un vaso precipitado.
- j. Si aún es visible la coloración roja en la lámina, repetir el proceso de decoloración con alcohol-ácido, tal como se describe anteriormente. Repetir este paso hasta eliminar los restos de fucsina.
- k. Cubrir las láminas con la solución de azul de metileno 0.1% (colorante de contraste).
- l. Mantenga las láminas con el colorante de contraste por un 1 minuto.
- m. Elimine el azul de metileno y enjuague con agua suavemente con un vaso precipitado; desde un extremo de la lámina en donde no se encuentre el extendido, durante 20 segundos.
- n. Deje secar las láminas a temperatura ambiente en un soporte de plástico.
- o. Colocar a cada una de ellas la etiqueta autoadhesiva correspondiente al código o ID de muestra correspondiente al rotulado previo con el lápiz con punta de diamante (esta etiqueta será colocada sobre el rotulado inicial).

Figura 8

Tinción de extendidos de muestras con fucsina fenicada al 1%



2.7.2.3. Lectura en el microscopio

- a. Colocar el objetivo en 10X para ajustar la luz.
- b. Subir el condensador a la posición de lectura y abrir el diafragma.
- c. Colocar una gota de aceite de inmersión directamente sobre el extendido de la muestra.
muestra.
- d. Luego, realizar la observación microscópica con el objetivo de inmersión (100X) del microscopio.
- e. Cada campo microscópico se debe observar en superficie y en profundidad, para lo cual se utilizará el tornillo micrométrico del microscopio. Avanzar de izquierda a derecha y viceversa del extendido de la muestra hasta observar un mínimo de 100 campos útiles.
- f. Siempre, realizar una lectura de 100 campos como mínimo para dar un resultado negativo.
- g. Al término de la lectura retirar la lámina de la platina del microscopio, limpiar el objetivo de 100X con papel lente y alcohol de 70%. Anotar la actividad de limpieza en el registro de uso del equipo.
- h. Si el estudio lo requiere, guardar las láminas en una caja porta láminas de plástico, de lo contrario, descartar las láminas en las cajas de desechos biológicos.

2.7.2.4. Interpretación

Tabla 1

Escala de Cuantificación de Bacilos Para Microscopía con Coloración Ziehl-Neelsen

Resultados de examen microscópico	Informe de resultado de BK
No se encuentra BAAR en 100 campos	Negativo (-)
Se observa de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados	Paucibacilar (Reportar Número exacto de bacilos)
Menos de 1 BAAR promedio por campo en 100 campos observados (10-99 bacilos en 100 campos)	Positivo (1+)
De 1 a 10 BAAR promedio por campo en 50 campos observados	Positivo (2+)
Más de 10 BAAR promedio por campo en 20 campos observados	Positivos (3+)

Nota: Manual para el diagnóstico de la tuberculosis. Adaptada por Organización Panamericana de la Salud. 2008.

2.7.3. Identificación del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

La prueba rápida BD MGIT™ TBc® se basa a partir de medio líquido Middlebrook 7H9 esta metodología se fundamenta en la identificación mediante el ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral rápido que se utiliza para diferenciar MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) y NMT (Micobacterias no tuberculosas). El complejo *Mycobacterium tuberculosis* libera al medio de cultivo durante su fase exponencial diferentes proteínas, una de ellas es el antígeno MPT64, específica del complejo, dentro de sus características se describe como altamente inmunogénica (Gómez et al., 2014). Si el antígeno MPT64 está presente en la muestra, se tornará de color rosado (en la línea roja). La línea del control positivo interno es incluida para validar adecuadamente el proceso. La prueba detecta las siguientes especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*.

2.7.3.1. Procesamiento de la Muestra. Trabajar sobre papel absorbente con base plastificada impermeable (Tipo Versi-Dry®) y empapararlo con Vesphene® 5%.

- **A partir de un cultivo MGIT positivo:**

- a. Realizar una baciloscopía con coloración Ziehl Neelsen a partir de una alícuota del cultivo procedente del tubo MGIT positivo dentro de los 5 días de positividad a partir del equipo BACTEC 960 MGIT.

- b. Vortexear el tubo MGIT por 15 segundos hasta asegurar que la suspensión está bien homogenizada.

- **A partir de un cultivo LJ positivo:**

- a. Emplear un cultivo con 3 a 4 semanas de crecimiento.

- b. Añadir 200 ul de agua destilada estéril a un tubo de poliestireno estéril de 14 ml Falcon.

- c. Con un loop de 10 µl o una espátula de acero estériles, tomar una cantidad representativa de colonias y mezclar con agua destilada estéril, evitando la presencia de cualquier medio sólido o contaminantes.

- d. Vortexear el criovial por 30 segundos hasta crear una suspensión uniforme.

- e. Asegurar la turbidez de la suspensión a Mc Farland 0.5.

- Insuficiente densidad en la suspensión puede generar un resultado falso-negativo.

- Subcultivar un nuevo LJ hasta obtener un crecimiento adecuado y repetir la prueba si es necesario.

2.7.3.2. Inoculación en el TBc Identification Test. El kit debe ser almacenado de 2-8°C, evitar la luz directa, humedad excesiva y alta temperatura, no se debe abrir la prueba de capilia hasta su utilización, evitar tocar el área de inoculación con las manos.

- a. Si la prueba está en refrigeración, dejar a temperatura ambiente en su bolsa antes de realizar la prueba.

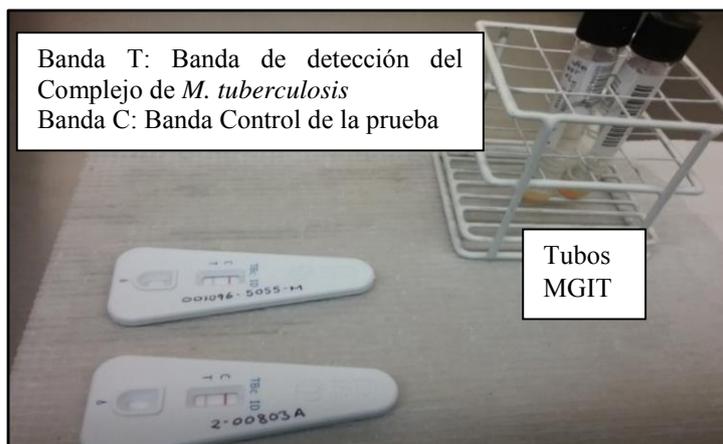
- b. Colocar la prueba en una superficie plana dentro de la CBS. Retirar la bolsa antes de realizar la prueba.
- c. Rotular en la parte superior de la prueba con el ID de muestra empleando un marcador indeleble.
- d. Tomar 100 μ l (2-3 gotas) de la muestra proveniente del medio líquido o sólido (MGIT+ o LJ+) con una pipeta de transferencia estéril e inocular en el área de inoculación.
- e. Cambiar de pipeta de transferencia entre una y otra muestra.
- f. Realizar la lectura en 15 minutos después de la aplicación y registrar el resultado según el formato del estudio.

2.7.3.3. Interpretación de la prueba

- a. Si las líneas T (2) y C (3) se aprecian coloreadas rosado/púrpura, la reacción será positiva para el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 9).
- b. Si la línea T (2) es un poco más tenue que la línea C (3), la reacción será positiva para el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.
- c. Si la línea T (2) no se observa, pero si se observa la línea C (3), la reacción será negativa para el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.
- d. Si no hay coloración de la línea C (3), es posible que haya ocurrido un error de proceso o que los reactivos o la placa hayan sufrido alguna clase de deterioro, por lo que hay que repetir la prueba y reportar como INVÁLIDO.

Figura 9

Test de Identificación del Complejo M. tuberculosis



Nota: Donde MGIT es el tubo indicador de crecimiento de la Micobacteria.

2.7.4. Determinación de la susceptibilidad a drogas antituberculosas de primera línea en BACTEC MGIT 960®

El método de cultivo bacteriológico automatizado BACTEC MGIT 960® (Becton Dickinson Diagnostic Instrument System, Inc.) permite obtener resultados de pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas en un menor tiempo que el método de las proporciones y a gran escala (permite 960 cultivos), sin embargo, tiene un costo mucho más alto. A diferencia del BACTEC 460®, el BACTEC MGIT 960® presenta la ventaja considerable de ser un método no radioactivo lo cual lo hace más seguro para el personal de laboratorio (Tortoli et al., 2002).

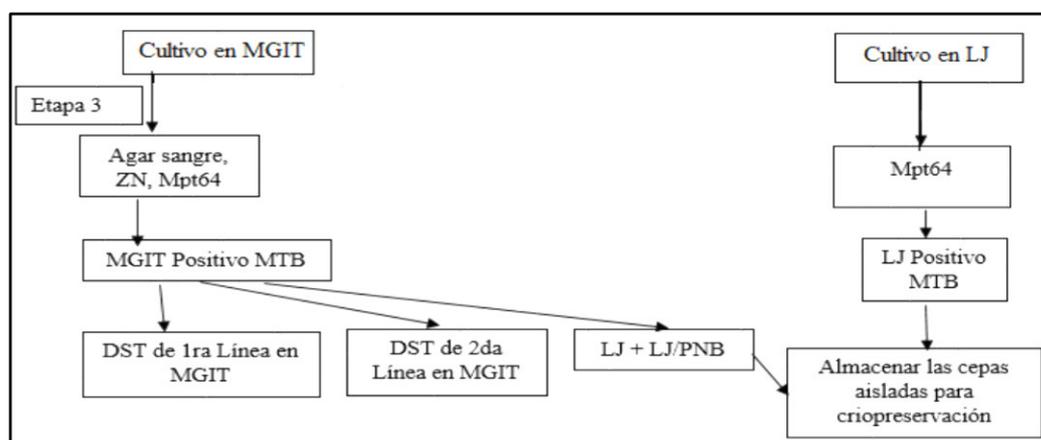
BBL™ MGIT™ 7 ml es un tubo que contiene caldo Middlebrook 7H9 modificado; el cual favorece el crecimiento y la detección de micobacterias. Este tubo contiene en el fondo un compuesto fluorescente embebido en un tapón de silicona; este tapón es sensible a la presencia del oxígeno disuelto en el caldo. La concentración inicial del oxígeno disuelto “apaga” la emisión desde el compuesto; aunque puede haber una muy pequeña emisión de fluorescencia. Después, el crecimiento activo y, por consiguiente; el consumo de oxígeno de los microorganismos permite que el compuesto florezca.

La prueba de susceptibilidad de primera línea en BACTEC MGIT 960® es una prueba cualitativa que toma entre 7 a 13 días. La prueba está basada en la detección del crecimiento de los aislamientos del *Mycobacterium tuberculosis* en tubos que contiene droga en comparación con un tubo sin droga (tubo control). El Equipo BACTEC MGIT 960® continuamente monitorea el incremento de fluorescencia de los tubos. El análisis de fluorescencia en los tubos que contienen droga comparado con el tubo control es usado para determinar los resultados de susceptibilidad a las drogas utilizadas. Finalmente, este equipo interpreta los resultados y reporta como “sensible” o “resistente” (Siddiqui y Rüsç-Gerdes, 2006).

En relación con la capacidad del BACTEC MGIT 960® para dar resultados de sensibilidad a drogas de primera línea, se ha encontrado una sensibilidad de 100% para las cuatro drogas (isoniazida, rifampicina, etambutol y estreptomycin) y un rango de especificidad de 89,8% para estreptomycin hasta 100% para rifampicina; siendo el tiempo promedio para dichos resultados de 6,5 días (Bemer et al., 2002) (método directo) y 9,9 días adicionales (Pfyffer et al., 1997) (método indirecto). La etapa 3 nos muestra el proceso que sigue el sedimento resuspendido luego de haberse confirmado el cultivo MGIT positivo (Figura 10).

Figura 10

Etapa 3: Prueba de susceptibilidad de drogas antituberculosas de 1ra y 2da línea



Nota: Donde MGIT es el tubo indicador de crecimiento de la Micobacteria, ZN es la técnica de coloración Zielh Neelsen, LJ es Löwenstein-Jensen, DST por sus siglas en inglés drug-susceptibility testing es la prueba de susceptibilidad a drogas anti-TB y LJ/PNB es el LJ que contiene el ácido paranitrobenzoico utilizado para la identificación de otras micobacterias.

2.7.4.1. Reconstitución de las drogas SIRE. Este procedimiento se llevará a cabo dentro de una cabina de flujo laminar (CFL) en el área de Preparación de Medios.

a. Coloca dentro de la CFL los frascos de las 4 drogas (S: Estreptomicina, I: Isoniazida, R: Rifampicina, E: Etambutol).

b. Trabajar solamente una droga por vez.

c. Retirar el sello de metal del frasco de droga con mucho cuidado.

d. Retirar la tapa de jebe con cuidado de no tocar la parte que da al interior del frasco.

e. Con una pipeta de transferencia estéril de 5mL colocar 4 ml (4000 µl) de agua destilada en el frasco con droga liofilizada y agitar con vórtex por lo menos 15 segundos hasta que se diluya por completo la droga.

f. Alicuotar 305 µl de cada droga en crioviales estériles de 1.5 ml y almacenar en congelación -20°C.

g. Vida útil: 6 meses.

2.7.4.2. Reconstitución de Droga PZA. Este procedimiento se llevará a cabo dentro de una CFL en el área de Preparación de Medios.

a. Coloca dentro de la CFL el frasco de droga PZA (Pirazinamida).

b. Retirar el sello de metal del frasco de droga con mucho cuidado.

c. Retirar la tapa de jebe con cuidado de no tocar la parte que da al interior del frasco.

- d. Con una pipeta de transferencia estéril de 5 ml colocar 2,5 ml de agua destilada en el frasco con droga liofilizada y agitar con vórtex por lo menos 15 segundos hasta que se diluya por completo la droga.
- e. Alicuotar 205 μ l de la droga en crioviales estériles de 1.5 ml y almacenar en congelación -20°C .
- f. Vida útil: 6 meses.

2.7.4.3. Preparación de tubos con y sin droga

- a. Trabajar en la CBS IIA (BSL-3) utilizando el equipo de protección personal adecuadamente y de manera obligatoria.
- b. Colocar un pedazo de papel Tipo Versi-Dry® sobre el área de trabajo dentro de la CBS IIA.
- c. Por cada prueba de sensibilidad colocar y disponer 5 tubos MGIT dentro de una cabina de bioseguridad y rotular cada uno con el nombre de la droga, control de crecimiento y código de muestra correspondiente.
- d. Suplementar cada tubo de crecimiento, usando 800 μ l de suplemento SIRE con un mismo tip para cada tubo y luego la droga correspondiente.
- e. Añadir 100 μ l de cada una de las drogas a utilizar a cada uno de los tubos.

2.7.4.4. Preparación del Inóculo Bacteriano. Trabajar el material contaminado sobre papel absorbente con base plastificada impermeable tipo Versi-Dry® y empapararlo con Vesphene® 5%.

- **A partir de medio sólido:**

- a. En un tubo de poliestireno de 14 ml estéril con tapa, adicionar 200 μ l de agua destilada estéril.

b. Tomar con una espátula de metal estéril una cantidad representativa de colonias crecidas en un tubo o de una placa con medio de cultivo sólido y colocarla en el tubo de poliestireno de 14 ml.

c. Realizar la homogenización de las colonias durante 1 minuto en el vórtex a máxima velocidad. Asegurarse disgregar completamente las colonias.

d. Agregar 2.80 ml de agua destilada estéril al tubo y homogenizar nuevamente con el vórtex como mínimo 15 segundos.

e. Luego que se ha conseguido la suspensión; se dejará reposar la solución por 20 minutos para que sedimenten los grumos o partes de la suspensión que no se ha disuelto adecuadamente.

f. Trasvasar el sobrenadante a otro tubo de poliestireno de 14 ml estéril con tapa y ajustar la turbidez a la escala 0,5 Mc. Farland.

g. Diluir 1 ml de esta solución en 4 ml de agua destilada estéril (proporción 1:5). Esta suspensión servirá como inóculo bacteriano en la prueba.

- **A partir de cultivo positivo en tubos MGIT:**

a. Un cultivo positivo podrá ser usado para la prueba de susceptibilidad hasta el quinto día (día 5) después de que el equipo BACTEC 960 haya detectado su positividad.

b. Si la prueba se realizará entre los días 1 o 2 de positividad, mezclar bien (vórtex) para romper los grumos. Dejar el tubo en reposo durante unos 5-10 minutos para que los clamps se depositan en el fondo. Usar el sobrenadante como inóculo bacteriano en la prueba.

c. Si la prueba se realizará entre los días 3, 4 ó 5 de positividad, mezclar bien (vórtex) para romper los grumos. Dejar el tubo en reposo durante 5-10 minutos y luego diluir 1,0 ml del caldo positivo con 4,0 ml de agua destilada (dilución 1:5). Esta suspensión se usará como inóculo bacteriano en la prueba.

d. Si el cultivo positivo tiene más de 5 días de positividad hacer un subcultivo en medio líquido y proceder como en los puntos anteriores.

e. Una vez preparado el inóculo bacteriano cierre bien la tapa del tubo MGIT y mézclelo completamente por inversión e inocule 500 µl a cada uno de los tubos con droga.

2.7.4.5. Dilución para Controles

a. Control SIRE: Realizar una dilución en proporción 1:100 tomando 100 µL del inóculo bacteriano y diluir en 9.9 ml de agua destilada estéril.

b. Control PZA: La dilución para PZA es de 1:10, tomando 0.5 ml de inóculo bacteriano y diluyéndolo en 4.5 ml de agua destilada.

c. Luego inocular 500 µl de esta dilución en el tubo Control de Crecimiento.

d. En cada uno de los tubos con droga sembrar directamente 500 µl del inóculo bacteriano.

2.7.4.6. Incubación

a. En los carriers de 5 posiciones (soporte de plástico) se colocan los tubos MGIT pertenecientes a: Control de Crecimiento SIRE (C), Estreptomycin (S), Isoniacida (I), Rifampicina (R) y Etambutol (E) (Figura 11). Cuidando de colocar el código de barras del carrier hacia adelante y colocar de izquierda a derecha los tubos en el orden descrito.

b. En los carriers de 2 posiciones colocar los tubos PZA pertenecientes a: Control de crecimiento PZA (C PZA) y Pirazinamida (PZA) cuidando de colocar el código de barras en el carrier hacia adelante y colocar de izquierda a derecha los tubos en el orden descrito.

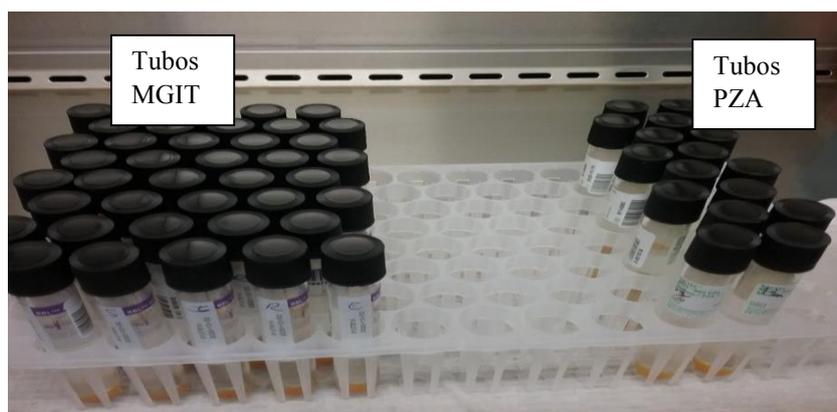
c. Abrir la bandeja de incubación destinada a las pruebas de sensibilidad del equipo BD BACTEC 960 MGIT.

d. Inmediatamente se iluminará el lector de código de barras. Hacer la lectura del código de barras de cada Carrier.

e. Observar que en el interior de la bandeja de incubación se encienden las luces indicadoras amarillas en 5 posiciones consecutivas, colocar el carrier correspondiente en la misma posición.

Figura 11

Prueba de sensibilidad de 1ra Línea



Nota: Donde MGIT es el tubo indicador de crecimiento de la Micobacteria y PZA es el antibiótico pirazinamida.

2.7.5. Determinación de la susceptibilidad a drogas antituberculosas de segunda línea en BACTEC MGIT 960®

Las principales drogas bactericidas de segunda línea usadas en el tratamiento de TB pertenecen a los grupos de los inyectables y quinolonas. El primer grupo, conformado por aminoglucósidos y péptidos cíclicos, se conocen desde los 80, pero eran aplicados para el tratamiento de otras enfermedades infecciosas. En Perú, los aminoglucósidos kanamicina y amikacina (Pestka, 1974 y Kawaguchi, 1976), y el péptido capreomicina (Stark, 1962) son usados actualmente en el tratamiento de TB-MDR. El grupo de las quinolonas se desarrolló entre las décadas de los 80 y 90 e incluyen compuestos de segunda, tercera y cuarta generación (Norris y Mandell, 1988). En Perú, la ciprofloxacina y ofloxacina han sido las quinolonas de elección hasta el 2013 (Mendoza-Ticona, 2013). Sin embargo, actualmente el Programa

Nacional de Tuberculosis recomienda el uso de levofloxacin, el isómero levógiro de la ofloxacin (Morrissey, 1996 y MINSA, 2013).

2.7.5.1. Reconstitución de drogas comerciales BD. En el caso de usar drogas comerciales del sistema BD BACTEC MGIT 960®. Los fármacos son comercializados por la marca BD para el sistema BACTEC MGIT 960® como fármacos liofilizados para uso en el laboratorio.

Los viales de cada droga correspondiente son reconstituídos en 4ml de agua destilada estéril y disolver mediante vortex. Luego se alícuota 110µl de la droga en crioviales de 1,5ml y puestos en criobox y almacenados a -20°C hasta su uso.

Para la droga Levofloxacin (1,5 µg/ml)

- a. Pesar 100 mg de la droga en un tubo de tapa a presión estéril
- b. Reconstituir la droga con 10 ml NaOH 0.1 N. Diluir completamente la droga con ayuda del vórtex. La concentración de la droga será de 10000 µg/ml (solución stock).
- c. Alicuotar 200 µl de la solución stock en crioviales estériles con tapa rosca y anillo de jebe de 1.5 ml y almacenar a -20°C.
- d. Vida útil: 6 meses.

2.7.5.2. Preparación de tubos con y sin droga

- a. Por cada prueba de sensibilidad colocar y disponer 8 tubos MGIT dentro de una cabina de bioseguridad en el área de BSL-3 y rotular cada tubo con el nombre de la droga, control de crecimiento y código de muestra correspondiente.
- b. Adicionar a cada tubo de crecimiento 800µl de suplemento SIRE, usando un tip diferente para cada tubo y luego la droga correspondiente.
- c. Añadir 100 µl de cada una de las drogas a utilizar a cada uno de los tubos.

2.7.5.3. Preparación del Inóculo Bacteriano

- **A partir de medio sólido:**

a. En un tubo de poliestireno de 14 ml estéril con tapa, adicionar 200 µl de agua destilada estéril.

b. Tomar con una espátula de metal estéril una cantidad representativa de colonias crecidas en un tubo o de una placa con medio de cultivo sólido y colocarla en el tubo de poliestireno de 14 ml.

c. Realizar la homogenización de las colonias durante 1 minuto en el vórtex a máxima velocidad. Asegurarse disgregar completamente las colonias.

d. Agregar 2.80 ml de agua destilada estéril al tubo y homogenizar nuevamente con el vórtex como mínimo 15 segundos.

e. Luego que se ha conseguido la suspensión; se dejará reposar la solución por 20 minutos para que sedimenten los grumos o partes de la suspensión que no se ha disuelto adecuadamente.

f. Trasvasar el sobrenadante a otro tubo de poliestireno de 14 ml estéril con tapa y ajustar la turbidez a la escala 0,5 Mc. Farland.

g. Diluir 1 ml de esta solución en 4 ml de agua destilada estéril (proporción 1:5).

Esta suspensión servirá como inóculo bacteriano en la prueba.

- **A partir de cultivo positivo en tubos MGIT:**

a. Un cultivo positivo podrá ser usado para la prueba de susceptibilidad hasta el quinto día después de que el equipo BACTEC 960 haya detectado su positividad.

b. El tubo MGIT positivo se guarda en la incubadora a 37°C hasta su uso.

c. Si la prueba se realizará entre los días 3, 4 ó 5 de positividad, mezclar bien mediante vórtex para romper los grumos. Dejar el tubo en reposo durante 5-10 minutos y luego

diluir 1,0 ml del caldo positivo con 4,0 ml de agua destilada (dilución 1:5) en un tubo de poliestireno de 14ml. Esta suspensión se usará como inóculo bacteriano en la prueba.

2.7.5.4. Dilución Para Controles

a. Realizar una dilución en proporción 1:100 tomando 100 μ l del inóculo bacteriano y diluir en 9.9 ml de agua destilada estéril en un tubo de poliestireno de 14ml y dar vórtex por 15 segundos. Luego, inocular 500 μ l de esta dilución en el tubo Control de Crecimiento.

b. En cada uno de los tubos con droga sembrar directamente 500 μ l del inóculo bacteriano.

2.7.5.5. Incubación

a. En los carriers de 8 posiciones colocar los tubos en el siguiente orden (empezando de izquierda a derecha): Tubo Control (“GC”); Kanamicina (KAN), Ofloxacina (OFX), Ácido ParaÁmino Salicílico (PAS), Etionamida (ETH) y Capreomicina (CAP) Moxifloxacina de 0.25 y Moxifloxacina de 1 (Figura 12), cuidando de colocar el código de barras del carrier hacia adelante.

b. En los carriers de 2 posiciones colocar los tubos pertenecientes al Control de crecimiento Levo (C) y Levofloxacina (LFX), cuidando de colocar el código de barras en el carrier hacia adelante y colocar de izquierda a derecha los tubos en el orden descrito.

c. El período de incubación para la prueba de sensibilidad puede tomar hasta 12 días como máximo. Cuando el control se torne positivo, el equipo terminará de hacer la lectura correspondiente a todos los tubos e interpretará los resultados.

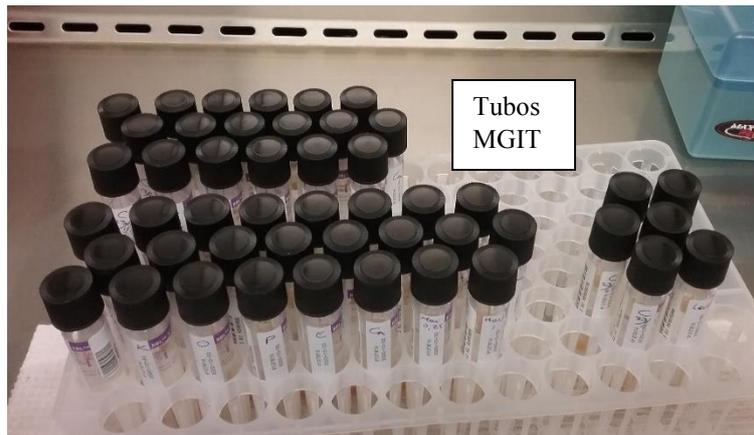
d. Inmediatamente el equipo lanzará una alerta sonora y una señal luminosa roja en la puerta de la bandeja de incubación.

e. Los resultados serán registrados en el Registro de resultados DST 2L para MGIT anotando la sensibilidad o resistencia a cada droga para cada prueba procesada.

f. Ya que al hacer la incubación de la prueba se selecciona en el equipo la opción de drogas indeterminadas, al momento del análisis de los resultados, se considerará resistente a aquellas drogas que tengan un reporte de crecimiento (UC) mayor o igual a 100, de lo contrario serán considerados como sensibles.

Figura 12

Prueba de sensibilidad de 2da Línea



Nota: Donde MGIT es el tubo indicador de crecimiento de la Micobacteria

2.7.6. Criopreservación de aislamientos para *M. tuberculosis*

La criopreservación por medio de la congelación es un método de elección, ya que los microorganismos detienen su crecimiento sin morir, garantizando al máximo la estabilidad genética. Los microorganismos se congelan en suspensión con un agente crio protector, en este caso en medio 7H9 con glicerol al 30% (Figura 13), y se guardan a temperaturas inferiores a 0°C (-80°C) con lo que le agua se congela; de esta forma, al no disponer de agua en forma líquida, no hay crecimiento bacteriano. Cuando se quiere trabajar con los aislamientos criopreservados, se debe realizar un proceso de descongelamiento progresivo, pasarlos a -20°C y luego llevarlo a refrigeración con temperatura de 2 a 8°C cumplidos estas temperaturas se encuentran listos para su uso (INS, 2015).

2.7.6.1. Rotulado de materiales

- a. Se necesita crioviales de 2ml y se etiqueta cada criovial con el ID de muestra empleando etiquetas resistentes al frío (Direct Thermal Cryo-Tags).
- b. Colocar los crioviales etiquetados en un criobox de policarbonato de 81 posiciones con tapa.
- c. Colocar el criobox fuera de la CBS hasta la dispensación de las alícuotas.
- d. También se usa tubo de poliestireno de 14 ml y se etiqueta cada tubo por muestra con el ID de muestra.

2.7.6.2. Criopreservación en medios

A. Medio 7H9

- a. Este procedimiento puede ser utilizado para micobacterias u otras bacterias.
- b. Trabajar todo el procedimiento dentro de la CBS IIA.
- c. En un tubo de poliestireno de 14 ml estéril y con una micropipeta y tips de 100-1000 µl, colocar 200 µl de agua destilada estéril.
- d. Utilizar una espátula de acero inoxidable estéril para tomar la mayor cantidad de colonias posible que se encuentran en un medio sólido (LJ) y colocarlas en la pared del tubo de poliestireno de 14 ml estéril a unos escasos milímetros del agua destilada estéril.
- e. Dispersar mediante movimientos circulares las colonias contenidas en la espátula y la pared del tubo de poliestireno. Realizar este proceso hasta retirar la totalidad de las colonias.
- f. Homogenizar completamente las colonias contenidas en el tubo de poliestireno con ayuda del vórtex por lo menos por 15 segundos.
- g. Se tiene rotulado 3 crioviales de 2ml con etiquetas resistentes al frío (Direct Thermal Cryo-Tags)

- h. Añadir medio de 7H9 con un volumen de 1.5ml con ayuda de una pipeta de transferencia estéril y homogenizar con el vórtex.
- i. La cantidad de medio de criopreservación debe ser suficiente para alcanzar una suspensión bacteriana con una turbidez no menor al nivel 4 (preferentemente entre 4 a 5) en la escala Mc Farland.
- j. Con una pipeta de transferencia estéril tomar 500 µl y dispensar en cada criovial debidamente rotulado.
- k. Colocar los 3 crioviales de 2ml de cada aislamiento en el criobox correspondiente y llevar a la refrigeradora de 4-8°C por 24 horas.
- l. Después de las 24 horas, trasladar el criobox a la ultracongeladora entre -60 y -80°C.

B. Medio Etanol al 70%

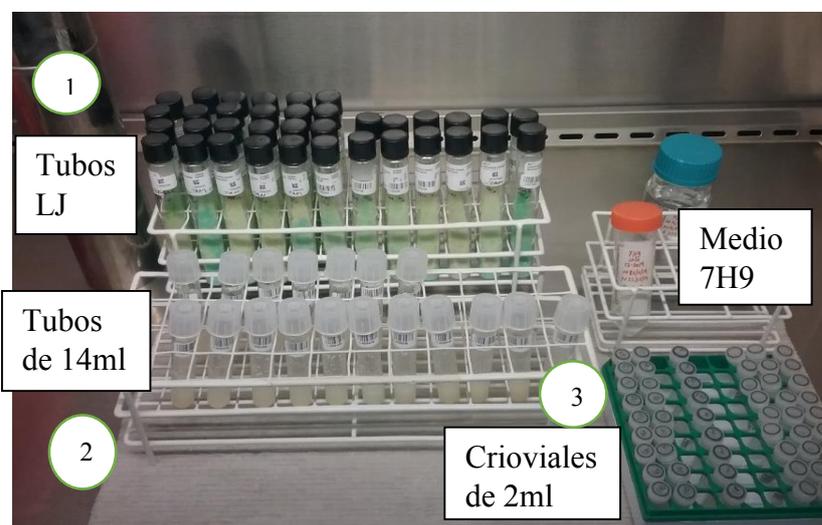
- a. Trabajar el material sobre papel absorbente con base plastificada impermeable tipo Versi-Dry® y empapararlo con Vesphene® 5%.
- b. Colocar el criovial que contiene 1ml de etanol al 70% y sus aislamientos en la CBS IIA.
- c. Transferir unas cuantas colonias de medio sólido en el criovial empleando una espátula de acero inoxidable.
- d. Rotular el criovial de 2ml con una etiqueta Dymo Labelwriter 450 que indique el ID de muestra, así mismo, en la tapa del criovial deberá rotularse con marcador indeleble la sigla "E". Colocar los crioviales en un criobox.
- e. Asegurarse de cerrar correctamente los crioviales conteniendo el aislamiento.
- f. Colocar el criobox a temperatura ambiente (15°C-25°C).

C. Medio Dubos

- a. Elaborar etiquetas que indiquen el ID de muestra y etiquetar 2 crioviales de 2ml con una etiqueta resistente al frío (Direct Thermal Cryo-Tags) nuevos estériles que contenga aproximadamente 1 ml de caldo Dubos enriquecido con suplemento y glicerol; en la tapa del criovial deberá rotularse con marcador indeleble la sigla “D”.
- b. Coloque el papel absorbente tipo Versi-Dry® en la CBS IIA y empápelos con Vesphene® 5%.
- c. Coloque los crioviales y sus aislados dentro de la CBS IIA.
- d. Transferir unas cuantas colonias de medio sólido (LJ) usando una espátula de acero inoxidable.
- e. Colocar los crioviales de 2ml en el criobox y rotularlos.
- f. Incubar los crioviales de 2ml durante 6 días a 37 ° C (+/- 2 °C).
- g. Después de ese periodo se lleva el criobox a la ultracongeladora a -80°C.

Figura 13

Proceso de aislamiento de M. tuberculosis en medio 7H9



Nota: Donde 1 muestra los tubos LJ (Löwenstein-Jensen) con crecimiento bacteriano, 2 muestra la cepa ya disuelta en medio 7H9 (medio de cultivo de micobacterias) y 3 se generan tres alícuotas de 0.5 ml c/u para criopreservar a -80°C.

2.7.7. *Ensayo con Sondas en Línea (LPA)*

Los ensayos con sondas en línea o LPA (Line Probe Assays) son pruebas moleculares que utilizan tiras reactivas de nitrocelulosa (tecnología DNA Strip) que contienen regiones moleculares parciales o sondas de los genes de resistencia en estudio. Esta tecnología se realiza extrayendo el ADN de las muestras en estudio, para luego realizar una amplificación por PCR múltiple de punto final seguido de una hibridación reversa del ADN amplificado a las sondas de ADN específico unido a las tiras de nitrocelulosa y por último se realiza la evaluación de las tiras para determinar la identificación de especie y si se detectan genes que confieren resistencia con la ayuda de una plantilla (Figura 14).

2.7.7.1. Genotype MTBDR_{plus} v.2.0. Esta prueba cualitativa in vitro es utilizada para la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su resistencia a rifampicina (RMP) y / o isoniazida (INH) de muestras clínicas positivas o negativas a frotis pulmonar y muestras cultivadas. La identificación de la resistencia a RMP se obtiene mediante la detección de las mutaciones asociadas más significativas de Gen rpoB (que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa). Para la detección de resistencia a INH, el gen katG (que codifica la catalasa peroxidasa) y se examinan la región promotora del gen inhA (que codifica la NADH enoil ACP reductasa). La prueba está indicada como una ayuda para el diagnóstico y está destinada para su uso en laboratorios médicos (Hain Lifescience, 2015).

Realizada a partir de muestra directa de esputo tiene una sensibilidad de 95,7% para rifampicina, 95,8% para isoniácida y 95,3% para TB-MDR. La misma prueba molecular a partir de cultivos tiene una sensibilidad de 100% para detectar resistencia a rifampicina, 97,5% para isoniácida y 96,9% para TB-MDR (Asencios et al., 2012).

La etapa 2 nos muestra los pasos que sigue el sedimento resuspendido, al procesar el sedimento que provenga de una mayor carga bacilar (Figura 15) así se procede a realizar los tres pasos (extracción de ADN, amplificación e hibridación).

Figura 14

Patrón representativo de las zonas de reacción en cada tira (DNA Strip) del sistema Genotype® MTBDRplus.

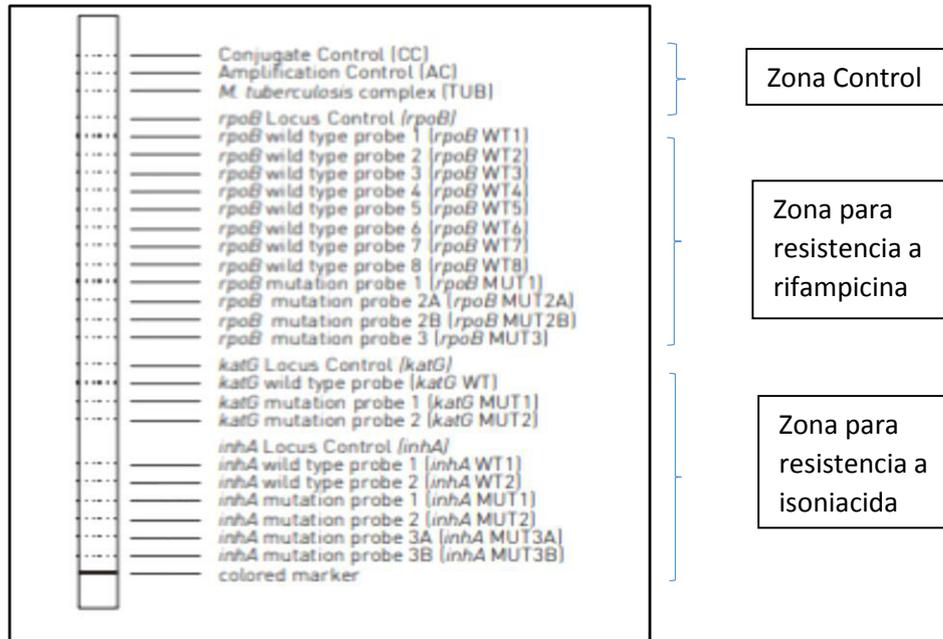
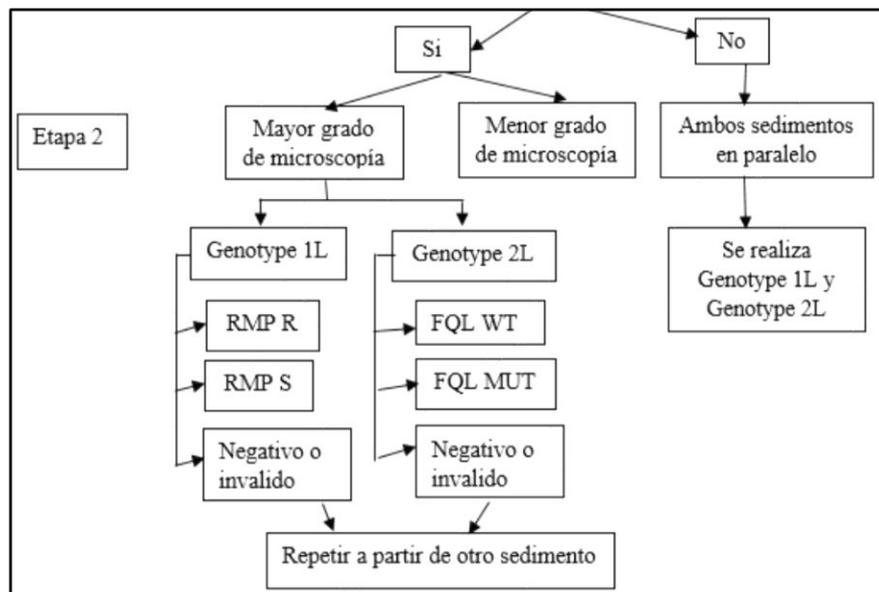


Figura 15

Etapa 2: Procesamiento de Genotype MTBDRplus y Genotype MTBDRsl



Nota: Donde RMP R es rifampicina resistente, RMP S es rifampicina sensible, FQL S es fluoroquinolonas sensibles, FQL R es fluoroquinolonas resistentes

A. Extracción de ADN

Dentro de la CBS IIA, transferir 500 µl de la muestra respiratoria descontaminada a un criovial cónico estéril para la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se utilizará el Kit GenoLyse® DNA Extraction, siguiendo las siguientes instrucciones:

- a. Centrifugar las muestras por 15 minutos a 14500 RPM (usar la microcentrífuga Eppendorf MiniSpin).
- b. Dentro de la CBS, eliminar el sobrenadante en el contenedor biológico que contiene la solución desinfectante empleando una micropipeta de 1000 µl.
- c. Resuspender el sedimento en 100 µL del buffer de lisis (A-LYS).
- d. Mezclar utilizando vórtex.
- e. Incubar las muestras durante 10 minutos a 98°C en el Thermomixer.
- f. Añadir 100 µl del buffer de neutralización (A-NB) al lisado celular y mezclar los tubos por inversión 10 veces.
- g. Centrifugar las muestras a 10 000 RPM durante 5 minutos.
- h. Transferir aprox. 150 µl del sobrenadante en un nuevo criovial cónico estéril etiquetado. Luego, transferir el criovial a un cooler resistente al frío y llevarlo a la refrigeradora del área de Esterilización y Lavado y almacenarlo de 2-8°C hasta realizar los siguientes procedimientos.

B. Amplificación múltiple (PCR Multiplex)

En el área de Pre-PCR (libre de amplicones), dentro de la Cabina de flujo laminar preparar el Máster Mix en un criovial de 1.5 ml colocando 10 µl de AM-A y 35 µl de AM-B por cada muestra. Antes de realizar la mezcla calcular el volumen necesario de cada uno de los reactivos de amplificación considerando el número de muestras más los controles.

- a. Con una micropipeta de 20 a 200 µl aspirar y expulsar repetidas veces hasta que hay una correcta homogenización de los reactivos. No usar vórtex.

- b. Dispensar alícuotas de 45 μL de la mezcla final en cada tubo de PCR.
- c. Colocar los tubos en una gradilla y transfíeralas al área de adición del ADN.
- d. En el área de Propósitos generales (Biología molecular) en la cabina sin flujo de aire, añadir 5 μl de la muestra de ADN en cada tubo de PCR con Máster Mix (rotulado).
- e. Luego colocar las muestras en el Termociclador y utilizar el siguiente programa de amplificación:

15 min 95°C		1 ciclo
30 seg 95°C	}	20 ciclos para muestra respiratoria
02 min 65°C	}	
25 seg 95°C	}	
40 seg 50°C	}	
40 seg 70°C	}	
08 min 70°C		1 ciclo

Una vez terminado el proceso de PCR, los productos de amplificación deben ser colocados en una caja vacía de tips estériles (limpia) y transferidos al área de Post-PCR, donde serán almacenados entre 2-8°C hasta el momento de la hibridación.

C. Hibridación

- **Limpieza:**

- a. Rocíar lejía al 5% en la superficie de la mesa de trabajo, micropipetas, tapa del equipo termociclador, lápiz, plumón indeleble, cajas de tips cerradas, entre otros.
- b. Dejar por 10 minutos.
- c. Remover la lejía de la superficie de la mesa de trabajo, equipo y materiales con papel toalla embebido con agua destilada estéril.
- d. Embeber papel toalla con alcohol al 70% y terminar la limpieza.

- **Proceso de Hibridación:**

- a. Utilizar el kit comercial

b. Precalentar en baño de agua los crioviales estériles de 2ml con las soluciones de Hibridante (HYB) y Astringente (STR) a 45°C antes de usar para disolver los precipitados.

c. Con una pinza de metal previamente desinfectada en alcohol de 70%, extraer del recipiente correspondiente el número de tiras de hibridación necesarias para la cantidad de muestras a procesar. Marcar cada una de las tiras con lápiz indicando el número asignado a cada una de ellas debajo de la línea de color rojo y protegerlas hasta el momento de su uso.

d. El tampón conjugado (CON) y tampón de sustrato (SUB) necesitan ser activados para el número requerido de muestras. Diluya en 990 µL de los diluyentes 10 µl del concentrado respectivo (CON-C con CON-D y SUB-C con SUB-D) por cada muestra.

e. Igualar los reactivos restantes a temperatura ambiente con la excepción de CON-C y SUB-C los mismos que deberán permanecer en refrigeración.

f. Con un tip estéril y una micropipeta agregar 20 µl de solución de desnaturalización (DEN) en un extremo de cada pocillo de la bandeja de hibridación. Descartar el tip en el recipiente de descarte.

g. Utilizar un tip estéril por muestra, agregar 20 µl de producto de PCR. Mezclar el producto de PCR y la solución de desnaturalización pipeteando suave y varias veces para asegurar la adecuada homogenización de la muestra. La mezcla se incubará durante 5 minutos a temperatura ambiente.

h. Utilizar un tip estéril por muestra. Agregar 1 ml de la solución HYB precalentado a cada pocillo, seguido de una agitación suave de la bandeja (levantar la bandeja e inclinar de atrás hacia adelante aproximadamente 4 veces) hasta conseguir un color verde homogéneo. Evitar la contaminación cruzada entre los pozos por salpicaduras.

i. Usar una pinza de metal previamente desinfectada con alcohol de 70%, para colocar una tira de hibridación en cada pocillo (la tira deberá ser marcada previamente con números de identificación de las muestras), colocando el marcador de color hacia arriba.

j. Luego, la bandeja con las tiras y reactivos se colocará en el TwinCubator® durante 30 min a 45°C. Se deberá ajustar la frecuencia de agitación del equipo para lograr una mezcla constante y completa de la solución.

k. Al final de la incubación retirar la bandeja de hibridación del equipo y utilizando un tip estéril por muestra; aspirar completamente la solución HYB. Eliminar los tips en el recipiente de descarte.

l. Utilizar un tip estéril por muestra. Agregar 1 ml de solución de lavado de astringencia (STR) de color rojo; precalentado a 45°C a cada pocillo e incubar durante 15 min a 45°C en TwinCubator®.

m. Al finalizar la incubación, retirar el STR con una micropipeta y un tip estéril teniendo cuidado de no retirar o tocar la tira.

n. Utilizar un tip estéril por muestra. Agregue 1 ml de solución de enjuague (RIN) a cada tira e incubar durante 1 min a temperatura ambiente en el TwinCubator®.

o. La solución de enjuague (RIN) será retirada suavemente con un tip estéril y una micropipeta de 100-1000µl teniendo cuidado de no retirar o tocar la tira.

p. Utilizar un tip estéril por muestra. Agregar 1 ml de Conjugado, previamente diluido, a cada pocillo e incubar durante 30 min a temperatura ambiente en el TwinCubator®.

q. La solución de conjugado será retirada con un tip estéril y una micropipeta de 100-1000 ul teniendo cuidado de no retirar o tocar la tira.

r. Utilizar un tip estéril por muestra. Agregar 1 ml de RIN e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente en el TwinCubator®. Una vez más, repetir este paso.

s. La solución de RIN será retirada suavemente entre cada lavado teniendo cuidado de no retirar o tocar la tira.

t. Agregar 1 ml de agua destilada a cada una de las tiras para su lavado.

u. Retirar el agua destilada usando una micropipeta y un tip por cada muestra.

v. Utilizando un tip estéril por cada tira, añadir 1 ml de Sustrato a cada tira e incubar a temperatura ambiente sin agitación, protegiendo de la luz. El tiempo requerido de la incubación del sustrato puede variar entre 3 y 20 minutos. La extensión del tiempo de incubación del sustrato puede conducir a un exceso de la tinción de fondo y puede afectar a la interpretación de los resultados.

w. Retirar cuidadosamente el sustrato diluido con cuidado de no retirar las tiras.

x. Lavar las tiras dos veces cubriéndolas totalmente con 1 ml de agua destilada, con el fin de detener la reacción. Con cuidado, retirar el agua destilada entre cada enjuague con un tip estéril y una micropipeta. Retirar las tiras de la bandeja con una pinza y séquelas entre dos capas de papel toalla absorbente.

y. Enjuagar la bandeja con agua destilada estéril (02 veces).

z. Envolver la bandeja con papel toalla, indicando la fecha de uso de la bandeja.

D. Evaluación e Interpretación del patrón representativo

a. Cada tira tiene un total de 27 zonas de reacción.

b. La señal (banda de reacción) de Control de Conjugación (CC) debe ser siempre positiva.

c. La banda CA es la banda de control de amplificación, debe ser positiva si la reacción de amplificación ha sido exitosa. De lo contrario la prueba deberá repetirse.

d. La banda TUB hibrida con amplicones generados a partir de todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Si la banda es negativa, el organismo de ensayo no es un miembro del complejo *M. tuberculosis* y no puede ser evaluada por este método de ensayo.

e. Las zonas de control del locus (rpoB, katG e inhA) detectan, cada una, una región amplificada del gen específico para el lugar correspondiente, y siempre que la muestra sea positiva deberán aparecer marcadas.

- f. Si todas las bandas de WT (tipo salvaje) (8 para el gen *rpoB*, 1 para el gen *katG* y 2 para el gen *inhA*) están presentes y las bandas de mutación NO están presentes (4 para el gen *rpoB*, 2 para el gen *katG* y 4 para el gen *inhA*) la muestra evaluada debe ser considerada SENSIBLE. Sólo las bandas que son tan fuertes como la banda de CA o más fuertes que ella debe ser consideradas al momento de hacer la lectura.
- g. Si una banda WT se encuentra ausente pero una banda mutante está presente, la muestra se considera RESISTENTE al fármaco en cuestión, en función del gen implicado.
- h. Si una banda WT está ausente pero ninguna banda mutante está presente entonces la muestra se considera también RESISTENTE a ese medicamento (Figura 16).
- i. Si la sonda *rpoB* MUT3 no aparece, una señal en la banda WT8 de menor intensidad que la banda control debería ser considerada como positiva.
- j. Cuando la banda MUT3 es positiva, una señal débil en la banda *rpoB*WT8 deberá ser considerada como negativa.
- k. Pegar las tiras de hibridación en el formato correspondiente de registro de Resultados *MTBDRplus*, hacer la lectura y reporte de resultados inmediatamente.

Figura 16

Resultado Resistente de la prueba cualitativa para MTBDRplus



Nota: Ausencia de las bandas *rpoB* WT3 y WT4 por lo tanto hay resistencia al fármaco Rifampicina. La ausencia en la banda *katG* WT nos dice que hay resistencia al fármaco Isoniacida.

2.7.7.2. Ensayo Genotype MTBDRsl v.2.0. El ensayo de sonda de línea Genotype MTBDRsl versión ha sido rediseñado para la detección molecular de mutaciones de fluoroquinolonas (FLQ) (genes *gyrA* y *gyrB* que confieren resistencia) y medicamentos inyectables de segunda línea (genes SLID) (genes *rr* y *eis*). Las sondas se dirigen a mutaciones comunes que codifican resistencia a estos agentes. Las sondas *gyrA* se dirigen a los codones 85 a 97 del gen, y las sondas *rrs* se dirigen a las posiciones de ácido nucleico 1401 a 1484. La inclusión de objetivos adicionales para mutaciones seleccionadas en la región *gyrB* (codones 536 a 541) y *eis*. Se informa que la región promotora (-10 a -14) para la resistencia KAN de bajo nivel mejora el rendimiento del ensayo para la detección de la resistencia FLQ y SLID (Hain Lifescience, 2015).

La XDR-TB se define como MDR-TB con resistencia adicional a cualquier fluoroquinolona (FQL) y al menos un fármaco inyectable a segunda línea entre los aminoglucósidos están las drogas Amikacina (AMK) y Kanamicina (KAN) y el péptido cíclico Capreomicina. La XDR-TB surge de la mala gestión del tratamiento de la MDR-TB (Hain Lifescience, 2015).

Los métodos convencionales para el cultivo de micobacterias y las pruebas de susceptibilidad a medicamentos son lentos y elaborados, y requieren procedimientos secuenciales para el diagnóstico. Durante este tiempo, los pacientes pueden ser tratados de manera inapropiada, las cepas resistentes a los medicamentos pueden continuar extendiéndose y puede producirse una amplificación de la resistencia. Por lo tanto, el diagnóstico molecular es rápido y la identificación de las cepas MDR-TB o XDR-TB son requisitos previos para la lucha mundial contra la TB.

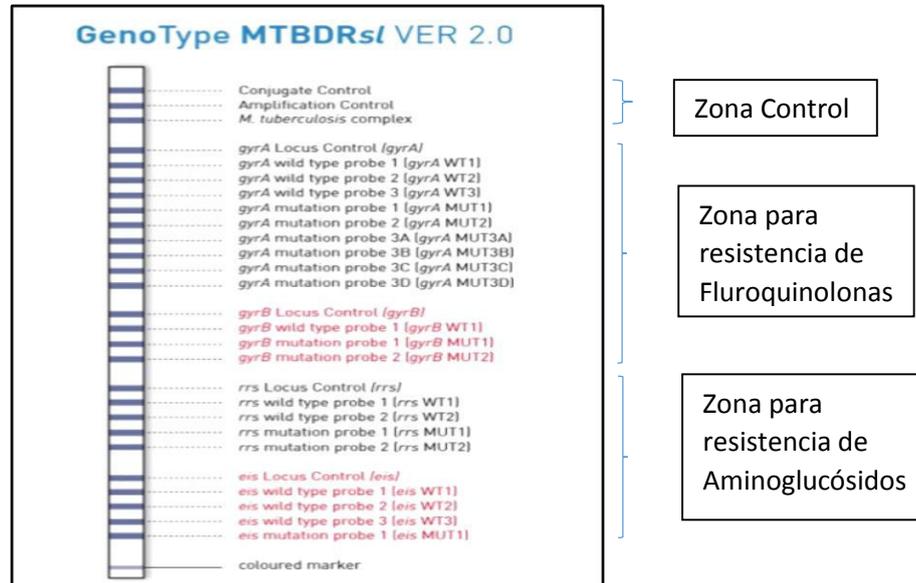
La prueba está indicada como una ayuda para el diagnóstico y está destinada para su uso en laboratorios médicos.

A. Evaluación e Interpretación de los resultados

- a. Cada tira tiene un total de 27 zonas de reacción (Figura 17).
- b. La banda de reacción del Control de Conjugado (CC) debe ser siempre positiva.
- c. La banda de reacción del Control de Amplificación (CA) debe ser positiva si la reacción de amplificación ha sido exitosa. De lo contrario la prueba deberá repetirse.
- d. La banda del complejo de Mycobacterium (TUB) se hibrida con amplicones generados a partir de todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Si la banda es negativa, el organismo de ensayo no es un miembro del complejo *M. tuberculosis* y no puede ser evaluada por este método de ensayo.
- e. Las zonas de control del locus (*gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis*) detecta una región amplificada del gen específico para el lugar correspondiente, y siempre debe ser positiva para que la prueba sea válida.
- f. Si todas las bandas de WT (tipo salvaje) para los genes *gyrA*, *gyrB*, *rrs* y *eis* están presentes y las bandas mutantes NO están presentes la muestra evaluada debe ser considerada SENSIBLE (Figura 18).
- g. Si una banda WT está ausente, pero una banda mutante está presente, la muestra se considera RESISTENTE al fármaco en cuestión, en función del gen implicado.
- h. Si una banda WT falta, pero ninguna banda mutante está presente entonces que la muestra se considera también RESISTENTE a ese medicamento.
- i. Los resultados serán válidos si la prueba detecta sensibilidad o resistencia a Fluoroquinolonas (FLQ), Aminoglucósidos / Péptidos cíclicos.
- j. Anotar los resultados en el formato correspondiente en el registro de Resultados Genotype MTBDRs/.

Figura 17

Patrón representativo de las zonas de reacción en cada tira (DNA Strip) del sistema Genotype® MTBDRsl

**Figura 18**

Resultado Sensible de la prueba cualitativa de MTBDRsl



Nota: La ausencia de bandas mutantes nos dice que el resultado es sensible a los fármacos (fluoroquinolonas y aminoglucósidos).

2.7.8. *Análisis estadístico de resultados*

2.7.8.1. Tiempo de crecimiento de M. tuberculosis. Los datos fueron analizados con el programa estadístico SPSS®. Los resultados fueron interpretados con pruebas de estadística descriptiva. Se realizó una prueba T para comparación de medias de muestras relacionadas con el fin de analizar la velocidad de crecimiento y el tiempo de detección en medio sólido, y en medio líquido. Se utilizó la prueba de McNemar para determinar la significancia estadística de los resultados.

2.7.8.2. Concordancias entre pruebas. Como prueba de oro para el análisis, se consideró el cultivo LJ. Para evaluar los resultados se utilizó el índice de Kappa, que determina la fuerza de concordancia o grado de acuerdo entre los métodos de laboratorio evaluados a través del cálculo del coeficiente de Cohen's Kappa (k), siguiendo la ecuación:

$$Kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}$$

Donde P_o es la proporción de concordancia observada, P_e es la proporción de concordancia esperada por azar y $1 - P_e$, representa el acuerdo o concordancia máxima posible no debida al azar. Entonces, el numerador del coeficiente Kappa expresa la proporción del acuerdo observado menos el esperado, en tanto que el denominador es la diferencia entre un total acuerdo y la proporción esperada por azar (Cortés et al., 2010)

Clásicamente la fuerza de concordancia según el índice de Kappa se interpreta como se describe en la siguiente tabla (Cortés et al., 2010)

Tabla 2

Interpretación de Índice Kappa

0	No acuerdo
0.0-0.2	Insignificante
0.2-0.4	Bajo
0.4-0.6	Moderado
0.6-0.8	Bueno
0.8-1.0	Muy bueno

Adaptado de Cortés et al., 2010.

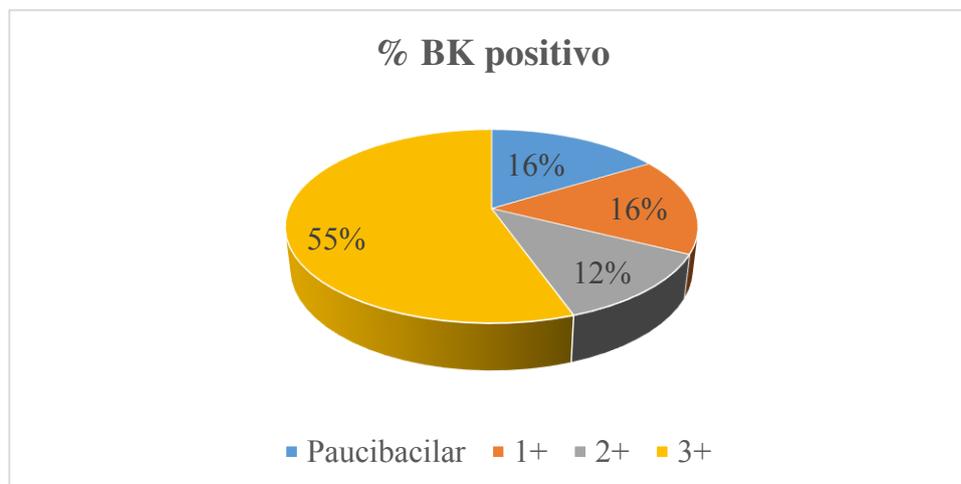
2.7.9. Resultados

Un total de 106 esputos fueron procesados en el SES-Lab en el año 2018, en su primera visita al laboratorio se les conoce como Tamizaje y para que el paciente sea aceptado en el proyecto de investigación debe cumplir la resistencia a Rifampicina y sensibilidad a Fluoroquinolonas, así del mismo paciente se recolecta 3 esputos en su primera visita, del esputo A y esputo B se descontamina por el método NALC-NaOH y del pellet descontaminado se realiza baciloscopia del pellet concentrado, sembrado en cultivos y de la mayor carga bacilar se realiza la extracción de ADN para el diagnóstico de Genotype y el esputo C es para almacenamiento a -80°C, en caso de contaminación de los esputos A y B se utilizará el esputo C.

2.7.9.1. Resultado de baciloscopia. En el Anexo A se puede observar la lista de reporte de resultados mostrando la visita, ID de muestra, tipo de muestra, aspecto de la muestra y el resultado de baciloscopia. Del total de 106 muestras se obtuvo que el 30.2% (32/106) presentó baciloscopia negativa y el 69.8% (74/106) presentó baciloscopia positiva, dentro del cual se encontró que la carga bacilar fue paucibacilar en el 16%, 1+ en el 16%, 2+ en el 12%, y 3+ en el 55% restante de las muestras que presentaron baciloscopia positiva (Figura 19).

Figura 19

Porcentaje de carga bacilar en baciloscopía positiva



2.7.9.2. Resultados de medios de cultivos. De las 106 muestras procesadas el esputo A se siembra 500 μ l en cultivo líquido MGIT y el esputo B se siembra 200 μ l en cultivo sólido LJ ambas siembras se dan luego del proceso de descontaminación para obtener los siguientes resultados.

A. Resultado de cultivo líquido MGIT

Se obtuvieron 25 muestras con resultado negativo la cual representa el 24% de muestras procesadas y 81 muestras con resultado positivo MTB la cual representa el 76%, de un total de 106 muestras de esputo espontáneo procesadas.

B. Resultado de cultivo sólido LJ

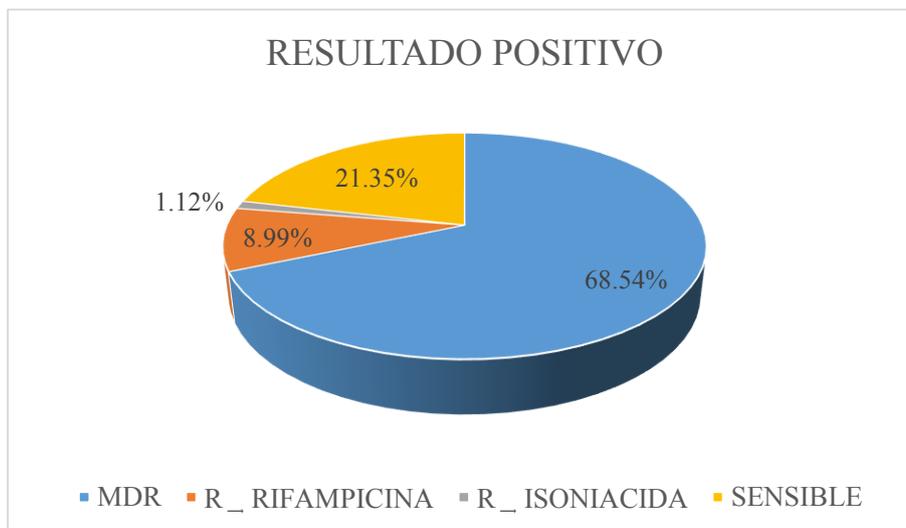
Se obtuvieron 72 muestras con resultado positivo MTB la cual representa el 68% de muestras procesadas y 34 muestras con resultado negativo la cual representa el 32%, de un total de 106 muestras de esputo espontáneo procesadas.

2.7.9.3. Resultados de Genotype MTBDRplus. Se obtuvieron 89 muestras con resultado positivo la cual representa el 84% de muestras procesadas, ya sea resultado Resistente o Sensible a Rifampicina e Isoniacida y 17 muestras con resultado negativo la cual representa el 16% de las 106 muestras procesadas.

De las 89 muestras positivas se determinó que 61 son Resistente para Rifampicina e Isoniacida (MDR) que representa el 68.54 %, 8 muestras salieron Resistente solo a Rifampicina que representa el 8.99%, 1 muestra Salió Resistente solo a Isoniacida que representa el 1.12% conocido como monorresistencia a uno de las drogas antituberculosas y 19 muestras salieron Sensible para Rifampicina e Isoniacida que representa el 21.35 % de muestras positivas (Figura 20).

Figura 20

Porcentaje de Resistencia o Sensibilidad de la prueba de Genotype MTBDRplus



Nota: Donde MDR: Multidrogo-resistente y R: resistente.

2.7.9.4. Resultados obtenidos por cada muestra. En general de las 106 muestras analizadas, 61 fueron positivas a los 4 métodos, 15 positivas a 3 métodos, 11 a dos métodos, 5 a por lo menos un método y 14 a ninguno. Es decir, en combinación los cuatro métodos pudieron detectar 92 muestras positivas a *M. tuberculosis* (Anexo B). La Tabla 3 resume los resultados obtenidos con cada uno de los métodos evaluados.

Tabla 3

Resultados obtenidos de las muestras sospechosas a TB, con cada uno de los métodos evaluados y sus tasas de detección (%)

	BK		MGIT		LJ		GENOTYPE 1L	
	N°	Tasa de detección (%)	N°	Tasa de detección (%)	N°	Tasa de detección (%)	N°	Tasa de detección (%)
POSITIVO	74	70%	81	76%	72	68%	89	84%
NEGATIVO	32	30%	25	24%	34	32%	17	16%
TOTAL	106	100%	106	100%	106	100%	106	100%

2.7.9.5. Velocidad de crecimiento de *M. tuberculosis*, en medios de cultivo LJ y MGIT. En la Tabla 4 se muestran los tiempos requeridos para el diagnóstico con ambos métodos. Según McNemar, los resultados variaron significativamente entre ambas pruebas ($p < 0,05$).

Tabla 4

*Tiempo promedio de crecimiento de *M. tuberculosis*, en medios de cultivo LJ y MGIT.*

++	N°	Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
MGIT	81	6	32	11.54	5.45
LJ	72	22	57	34.15	9.97

2.7.9.6. Concordancia entre los métodos de laboratorio evaluados. Al realizar test de Kappa para determinar el acuerdo entre pruebas, se obtuvieron los resultados que se presentan en la Tabla 5 (Anexo C).

Tabla 5

Resultados de la prueba de kappa entre pruebas

*	LJ	MGIT	BK	GENOTYPE 1L
LJ	1	N.A	N.A	N.A
MGIT	0.604	1	N.A	N.A
BK	0.516	0.594	1	N.A
GENOTYPE 1L	0.476	0.647	0.613	1

Notas: Donde * en las columnas la prueba de oro, en las filas la prueba que se está evaluando

y ** N.A: No aplica.

III. APORTES MÁS DESTACABLES A LA EMPRESA

SES cuenta con un laboratorio de investigación que realiza pruebas de amplio nivel de complejidad para asegurar el diagnóstico de tuberculosis y la determinación de la resistencia a drogas en menos de 12 días.

Cuenta con profesionales que son seleccionados por su amplio nivel de entrenamiento además posee recursos tecnológicos de vanguardia que responden a las actuales necesidades de investigación y capacitación que tienen los diversos estudios que se desarrollan en nuestro país y en la región.

El 14 de noviembre del 2017 el laboratorio de Socios En Salud, de nivel de bioseguridad III, obtuvo la certificación internacional ISO9001 NQA/UKAS; la cual concluyó satisfactoriamente con la auditoría de certificación del Sistema de Gestión de Calidad bajo la Norma ISO 9001:2015.

La certificadora NQA entidad acreditada por UKAS, Servicio de Acreditación del Reino Unido, así lo reconoce con la certificación ISO 9001. Para ello, SES-Lab cumplió con un conjunto de principios que garantizan la salud y la mejora continua de los procesos y del servicio que se brinda a los pacientes; además, de la reducción de riesgos, gestión eficaz de procesos, prevención de errores, control de costos de calidad; superación de la expectativa de nuestros usuarios y clientes; entre otros.

IV. CONCLUSIONES

- ❖ La baciloscopía es un método de fácil implementación, de bajo costo y rápido, en este trabajo se obtuvieron 74 muestras positivas con una tasa de detección del 70%, tuvo una concordancia moderada ($k=0.516$) con respecto a la prueba de oro.
- ❖ En esta investigación el medio de cultivo sólido LJ fue utilizado como prueba de oro para evaluar las otras técnicas de diagnóstico. En un promedio de 34.15 días, el medio de cultivo sólido LJ pudo detectar *M. tuberculosis* en 72 (68%) de las muestras incluidas en este estudio y en 34 no hubo crecimiento bacteriano. Se obtuvo moderada concordancia con las demás técnicas, pero requiere de mucho tiempo, por lo que puede complementarse con otros métodos que acorten los tiempos de respuesta y favorezcan la eficiencia del diagnóstico.
- ❖ El medio de cultivo líquido MGIT detectó el agente en el 76% de las muestras analizadas. Con un promedio 11.54 días en un rango de 6 – 32 días para emitir un diagnóstico. Cabe destacar que el tiempo promedio de crecimiento fue de 20 días menos que con el tiempo del medio de cultivo sólido LJ. En general se obtuvo una concordancia buena con respecto a los demás métodos.
- ❖ La detección de *M. tuberculosis* por técnicas moleculares es de gran utilidad porque ha permitido un diagnóstico más rápido (48 horas) respecto del cultivo y más sensible con respecto a la baciloscopía, en este trabajo se utilizó la prueba de sonda lineal Genotype® MTBDRplus donde se obtuvieron 89 muestras positivas (84% de tasa de detección) y tuvo concordancia buena y moderada con respecto a los demás métodos de diagnóstico evaluados en esta investigación y permite alcanzar el objetivo general de esta investigación que es implementar un método que acorte el tiempo de detección y favorezca a la emisión de la rapidez en la emisión de resultado en el diagnóstico de TB.

- ❖ Las cuatro pruebas tuvieron concordancia positiva entre sí, que varió entre moderada a buena y en conjunto detectaron 92 muestras positivas. Quiere decir que en combinación aumentaron la sensibilidad de detección, ya que se obtuvieron resultados positivos por todos los métodos.

V. RECOMENDACIONES

- ❖ Sensibilizar a la población en forma permanente sobre los riesgos de la transmisión de la tuberculosis.
- ❖ Brindar una adecuada orientación al sintomático respiratorio identificado, para la entrega de una muestra de buena calidad; se debe mantener un minucioso control de calidad de los resultados emitidos.
- ❖ Las muestras respiratorias deben llegar laboratorio en un rango de temperatura de 2 a 8°C pues esto facilita el proceso de descontaminación porque inhibe el sobrecrecimiento de las bacterias contaminantes.
- ❖ Todos los reactivos usados en el laboratorio se deben registrar número de lote y verificar la fecha de expiración antes de usarlo.

VI. REFERENCIAS

- Alarcón, V., Alarcón, E., Figueroa, C. y Mendoza-Ticona, A. (2017). Tuberculosis en el Perú: situación epidemiológica, avances y desafíos para su control. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública (Lima)*, 34(2).
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.342.2384>
- Alcaide, F. & Santín, M. (2008). Tuberculosis multirresistente. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Elsevier*, 26(13), pp.54–60.
<https://doi.org/10.1157/13128781>
- Araya Kutscher, F. (2014). *Descripción de la tuberculosis multidrogo-resistente en Chile, periodo 2008 -2011*. [Tesis de maestría, Universidad de Chile]. Repositorio de campus Universidad de Chile.
http://campusesp.uchile.cl:8080/dspace/bitstream/handle/123456789/371/Tesis_FRANCISCA%20ALEJANDRA%20ARAYA%20KUTSCHER.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Asencios, L., Quispe N., Sanabria H. y Yi A. (2005). *Manual de Procedimientos de Laboratorio para Diagnóstico y Susceptibilidad de Mycobacterium tuberculosis*, Instituto Nacional de Salud. Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública, Red Nacional de Laboratorio. Serie de Normas Técnicas N° 10 Lima. <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/2376.pdf>
- Asencios, L., Galarza, M., Quispe, N., Vásquez, L., Leo, E., Valencia, E., Ramírez, J., Acurio, M., Salazar, R., Mendoza-Ticona, A., Cáceres, O. (2012). Prueba molecular Genotype® MTBDRplus, una alternativa para la detección rápida de tuberculosis multidrogorresistente. *Revista Peruana de Medicina Experimental*

y *Salud Pública*, 29(1).

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342012000100014

Azizi, M.& Bahadori, M. (2011). A brief history of tuberculosis in Iran during the 19th and 20th centuries. *Archives of Iranian Medicine*, 14(3), pp. 215-219.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21529117/>

Barnes, D. (2000). Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. *Microbes and Infection*, 2(4), pp. 431-440. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00323-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00323-3)

Bemer, P., Palicova, F., Rusch-Gerdes, S., Drugeon, H.B., Pfyffer, G.E. (2002). Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(1), pp. 150-154.

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.40.1.150-154.2002>

Bermejo, M.C., Clavera, I., Michel de la Rosa, F.J. y Marín, B. (2007). Epidemiología de la tuberculosis. Epidemiology of tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 30 (2), pp. 7–20.

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272007000400002

Bunyan, J. (1993). Brief history of an age –old disease. *World Health*, 46 (4), pp. 22-23. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/326265>

- Caminero, J. (2010). Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14(4), pp. 382–390. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20202293/>
- Caminero, J. (2015). Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Revista Clínica Española*, 216(2), pp. 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.rceng.2015.11.001>
- Cardona Pere-Joan. (2017). What We Have Learned and What We Have Missed in Tuberculosis Pathophysiology for a New Vaccine Design: Searching for the “Pink Swan.” *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00556>
- Cartes Parra, J.C. (2013). Breve historia de la tuberculosis. *Revista Habanera de Ciencias médicas (La Habana)*, 17(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2018000300353
- Cortés, R. E., Rubio, J.A. & Gaitán, H. (2010). Métodos estadísticos de evaluación de la concordancia y la reproducibilidad de pruebas diagnósticas. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 61(3), pp. 247-255. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v61n3/v61n3a09.pdf>
- Farga, V. & Caminero, J.A. (2012). *Tuberculosis* (3ra ed.). Revista. Medica de Chile (Santiago), 139(5), pp. 681-682. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000500019>

- Feldman, W.H. & Hinshaw, H.C. (1944). Effects of streptomycin on experimental tuberculosis in guinea pigs: a preliminary study. *Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, 19(1), pp. 593-599.
<http://scielo.sld.cu/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S1729-519X200900020000300014&lng=es&pid=S1729-519X2009000200003>
- Flores, N. (2018). Situación epidemiológica de tuberculosis en trabajadores de salud. Perú 2013 - 2018. *Bol Epidemiológico Perú*, 27(52), pp. 1234-7.
<https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2018/52.pdf>
- Golpe, A., Lado, F., Cabarcos, A. y Ferreiro, M. (2002). Clínica de la tuberculosis. *Monografía Médica Integral. Servicio de Neumología y Medicina interna*, 39(5), pp. 181-191. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-10621>
- Gómez, I., Llerena, C. y Zavaleta, A. (2014). Evaluación de la técnica BD MGIT TBc para identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista de Salud Pública*, 16 (5), pp. 765-771.
<https://www.scielosp.org/pdf/rsap/2014.v16n5/765-771>
- González Tapia, M. (2014). La tuberculosis pulmonar, enfermedad reemergente en Cuba. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, 39(1).
<http://revzoilomarinellosld.cu/index.php/zmv/article/view/305>
- Hain Lifescience. (2015). *GenoType® MTBDRplus Ver 2.0. Instructions for Use*.
<http://www.hain-lifescience.de/pdf/mtbdrplus>
- Hain Lifescience. (2015). *GenoType® MTBDRsl Ver 2.0. Instrucciones de uso*.
<http://www.hain-lifescience.de/en/instructions-for-use.html>

Huapaya Romero, R. (2018). *Factores de Riesgo asociados a tuberculosis multidrogorresistente en pacientes del Centro de Salud San Cosme - La Victoria. 2016 y 2017*. [Tesis de Licenciatura, Universidad Ricardo Palma]. RepositorioURP.
<https://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/1406/RHUAPAYA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Instituto Nacional de Salud. (2015). *Conservación y recuperación de aislamientos de micobacterias. Proceso en investigación en salud pública*.

Jave, H., Contreras, M. y Hernández, V. (2017). Situación de la tuberculosis multirresistente en Perú. *Acta médica del Perú*, 34(2).
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172017000200007

Kawaguchi, H. (1976). Discovery, chemistry, and activity of amikacin. *The Journal of Infectious Diseases*, 134(1), pp. 242-248.
https://doi.org/10.1093/infdis/135.supplement_2.s242

Lehmann, J. (1964). Twenty years afterward historical notes on the discovery of the antituberculosis effect of paraminosalicylic acid (PAS) and the first clinical trials. *The American review of respiratory disease*, 90(1), pp. 953-6. PMID: 14233801

McDermott, W. (1969). The story of INH. *The Journal of Infectious Diseases*, 119(6), pp. 678-683. <https://doi.org/10.1093/infdis/119.6.678>

Mendoza-Ticona, A, Moore, DA, Alarcón, V, Samalvides F y Seas, C. (2013).

Propuesta de esquemas de tratamiento antituberculosis basados en la susceptibilidad A isoniacida y rifampicina. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica (Lima)*, 30(2), pp. 197-204.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342013000200006

Ministerio de Salud, dirección general de epidemiología (MINSA-DGE). (2013).

Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectadas por tuberculosis.

http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/newtb/Archivos/norma_tecnica.pdf

Ministerio de Salud. (2013). *Norma técnica de salud para la atención integral de las personas afectadas por tuberculosis.*

<http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20180308083418.pdf>

Morrissey, I., Hoshino, K., Sato, K., Yoshida, A., Hayakawa, I. y Bures, MG. (1996).

Mechanism of differential activities of ofloxacin enantiomers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), pp. 1775–84.

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.40.8.1775>

Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2010). *Microbiología médica*. (7ª ed.).

Elsevier 29(1), pp. 297-301.

https://www.academia.edu/32691727/Microbiologia_Medica_de_Murray_7ma_Edicion

Norris, S. y Mandell, GL. (1988). *The quinolones: history and overview*, (San Diego) Academic Press Inc.

Organización Mundial de la Salud. (2016). *Aplicación de la estrategia fin de la TB: Aspectos esenciales*. Ginebra.
http://www.who.int/tb/publications/2015/end_tb_essential_spanish_web.pdf?ua=1.

Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Manual Para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte I Baciloscopía*. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud.
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/782>

Organización Panamericana de la Salud. (2008). *Manual Para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte II Cultivo*. Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud.
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/18616>

Pérez C., Hayvin; Garcia S., Eberto; Perez C., Nuvia y Samper N., Juan A. (2009). Historia de la lucha antituberculosa. *Revista Habanera de Ciencias médicas (La Habana)*, 8(2). ISSN 1729-519X.

Pestka, S. (1974). The use of inhibitors in studies on protein synthesis. *Methods in Enzymol*, 30(1), pp. 261-282. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(74\)30030-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(74)30030-4)

Pfyffer, GE., Welscher, HM., Kissling, P., Cieslak, C., Casal, MJ. y Rüscher-Gerdes, S. (1997). Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *The Journal*

Clinical Microbiology, 35(2), pp. 364- 368.
<https://doi.org/10.1128/jcm.35.2.364-368.1997>

Ríos Vidal, J. (2018). *Situación de Tuberculosis en el Perú y la respuesta del Estado (Plan de Intervención, Plan de Acción)*. MINSA.
<http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20180605122521.pdf>

Rivera Morales, L., Valdez Sandoval, J. y Rodríguez Padilla, C. (2018). Diseño de un laboratorio de bioseguridad nivel 3 (BSL-3), *SEGLA*.
https://www.researchgate.net/publication/327139698_DISENO_DE_UN_LABORATORIO_DE_BIOSEGURIDAD_NIVEL_3_BSL-3

Schluger, NW. & Rom, WN. (1998). The host immune response to tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157(3), pp. 679-691.
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.3.9708002>

Siddiqui, S. & Rüsç-Gerdes, S. (2006). *MGIT Procedure Manual for BACTEC 960 TB System*. FIND Diagnostics. https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf

Socios en Salud Sucursal Perú. (2019). *Manual de Políticas SES*.
<https://partnersinhealth.sharepoint.com/sites/InfoHub/SitePages/Peru.aspx>.

Socios en Salud Sucursal Perú. (2021). *La historia de cinco corazones y una sola misión: garantizar el acceso a la salud para todos*.
<https://sociosensalud.org.pe/la-historia-de-cinco-corazones-y-una-sola-mision-garantizar-el>

[accesosaludparatodos/?fbclid=IwAR36Cr0vuvRaBjPDqMINwZqUCrXceh80PHQJAih4YofW9wQGIi7A819aMs](http://www.accesosaludparatodos/?fbclid=IwAR36Cr0vuvRaBjPDqMINwZqUCrXceh80PHQJAih4YofW9wQGIi7A819aMs)

Southeastern National Tuberculosis Center (SNTC) (2009), *Tuberculosis fármacorresistente: una guía práctica para la atención médica del paciente*.
http://sntc.medicine.ufl.edu/Files/drtbspanish/documents/tb_farmacorresistente_guia.pdf.

Stark, WM., Higgins, CE., Wolfe, RN., Hoehn, MM. y McGuire, JM. (1962). Capreomycin, a new antimycobacterial agent produced by *Streptomyces capreolu* J sp. n. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 596-606.

Tankeshwar, A. (2013). *Ziehl-Neelsen Technique (AFB Staining): Principle, Procedure and reporting*. <http://microbeonline.com/zielh-neelsen-technique-principle-procedurereporting/>.

Tortoli, E., Benedetti, M., Fontanelli, A. y Simonetti, M. (2002). Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460 TB method and the agar plate method of proportion. *Journal of clinical microbiology*, 40(1), pp. 607-610.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.607-610.2002>

Van Crevel, R., Ottenhoff, TH. y van der Meer, JW. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), pp. 294-309. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.294-309.2002>

- Velayati, A., Farnia, P. y Masjedi, M. (2013). Letter to Editor The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 6(4), pp. 307–309.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3631557/>
- Uplekar, M., Weil, D., Lonroth, K., Jaramillo, E., Lienhardt, C. y Dias, H.M. (2015). WHO's new End TB Strategy. *The Lancet*, 385 (9979):1799-801.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60570-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60570-0).
- Wingfield, T., Tovar, M.A., Huff, D., Boccia, D., Saunders, M.J. y Datta S. (2016). Beyond pills and tests: addressing the social determinants of tuberculosis. *Clinical Medical (Londres)*, 16(6), pp. 79-91.
<https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-6-s79>.
- World Health Organization. (2012). *Multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)*.
<https://www.who.int/news/item/13-01-2012-drug-resistant-tuberculosis>
- World Health Organization. (2015). *The End TB Strategy. Global strategy and targets for tuberculosis prevention care and control after 2015*.
<https://www.aidsdatahub.org/sites/default/files/resource/end-tb-strategy-2015.pdf>
- World Health Organization. (2016). *Global Tuberculosis Report 2016*.
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250441/9789241565394-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

World Health Organization. (2019). *Global tuberculosis report 2019*.

[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-
eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf)

VII. ANEXOS

Anexo A. Lista de reporte de resultados de Baciloscopía del proyecto de investigación “Fin de la tuberculosis etapa 2” del año 2018.

#	Visita	Id Muestra	Tipo Muestra	Aspecto	Resultado
1	TAM	1-00082A	Esputo Espontáneo	Salival	Negativo
2	TAM	1-00084A	Esputo Espontáneo	Mucosa	3+
3	TAM	1-00095A	Esputo Espontáneo	Mucosa	2+
4	TAM	1-00107A	Esputo Espontáneo	Mucosa	Negativo
5	TAM	1-00108A	Esputo Espontáneo	Mucosa	1 BAAR en 100 campos observados
6	TAM	1-00112A	Esputo Espontáneo	Muco-Purulenta	3+
7	TAM	1-00116A	Esputo Espontáneo	Mucosa	1+
8	TAM	1-00117A	Esputo Espontáneo	Mucosa	Negativo
9	TAM	1-00125A	Esputo Espontáneo	Mucosa	2+
10	TAM	1-00127A	Esputo Espontáneo	Salival	3+
11	TAM	1-00129A	Esputo Espontáneo	Hemoptoica	3+
12	TAM	1-00133A	Esputo Espontáneo	Hemoptoica	2+
13	TAM	1-00144A	Esputo Espontáneo	Salival	3+
14	TAM	1-00152A	Esputo Espontáneo	Salival	Negativo
15	TAM	1-00161A	Esputo Espontáneo	Mucosa	Negativo
16	TAM	1-00162A	Esputo Espontáneo	Mucosa	3+
17	TAM	1-00164A	Esputo Espontáneo	Mucosa	3+
18	TAM	1-00181A	Esputo Espontáneo	Mucosa	3+
19	TAM	1-00191A	Esputo Espontáneo	Salival	Negativo
20	TAM	1-00210A	Esputo Espontáneo	Salival	1+
21	TAM	1-00212A	Esputo Espontáneo	Mucosa	3+
22	TAM	1-00223A	Esputo Espontáneo	Hemoptoica	3+
23	TAM	1-00240A	Esputo Espontáneo	Muco-Purulenta	3+
24	TAM	1-00242A	Esputo Espontáneo	Salival	3+
25	TAM	1-00243A	Esputo Espontáneo	Muco-Purulenta	3+
26	TAM	1-00279A	Esputo Espontáneo	Mucosa	3+
27	TAM	1-00283A	Esputo Espontáneo	Salival	1+
28	TAM	1-00284A	Esputo Espontáneo	Salival	Negativo
29	TAM	1-00289A	Esputo Espontáneo	Salival	3+
30	TAM	1-00291A	Esputo Espontáneo	Salival	3+
31	TAM	1-00295A	Esputo Espontáneo	Salival	6 BAAR en 100 campos observados
32	TAM	1-00298A	Esputo Espontáneo	Salival	Negativo
33	TAM	1-00316A	Esputo Espontáneo	Muco-Purulenta	3+
34	TAM	1-00322A	Esputo Espontáneo	Salival	3+

35	TAM	1-00325A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
36	TAM	1-00339A	Espujo Espontáneo	Mucosa	Negativo
37	TAM	1-00343A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
38	TAM	1-00344A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
39	TAM	1-00347A	Espujo Espontáneo	Salival	1+
40	TAM	1-00350A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
41	TAM	1-00361A	Espujo Espontáneo	Salival	2+
42	TAM	1-00369A	Espujo Espontáneo	Mucosa	Negativo
43	TAM	1-00370A	Espujo Espontáneo	Mucosa	1+
44	TAM	1-00375A	Espujo Espontáneo	Mucosa	3+
45	TAM	1-00379A	Espujo Espontáneo	Mucosa	2 BAAR en 100 campos observados
46	TAM	1-00381A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
47	TAM	1-00384A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
48	TAM	1-00405A	Espujo Espontáneo	Mucosa	Negativo
49	TAM	1-00410A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
50	TAM	1-00411A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
51	TAM	1-00413A	Espujo Espontáneo	Mucosa	2+
52	TAM	1-00422A	Espujo Espontáneo	Salival	8 BAAR en 100 campos observados
53	TAM	1-00436A	Espujo Espontáneo	Muco-Purulenta	3+
54	TAM	1-00440A	Espujo Espontáneo	Salival	1+
55	TAM	2-00067A	Espujo Espontáneo	Salival	6 BAAR en 100 campos observados
56	TAM	2-00069A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
57	TAM	2-00074A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
58	TAM	2-00077A	Espujo Espontáneo	Mucosa	3+
59	TAM	2-00082A	Espujo Espontáneo	Mucosa	1 BAAR en 100 campos observados
60	TAM	2-00086A	Espujo Espontáneo	Salival	1 BAAR en 100 campos observados
61	TAM	2-00089A	Espujo Espontáneo	Mucosa	2+
62	TAM	2-00099A	Espujo Espontáneo	Mucosa	2+
63	TAM	2-00105A	Espujo Espontáneo	Mucosa	4 BAAR en 100 campos observados
64	TAM	2-00155A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
65	TAM	2-00160A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
66	TAM	2-00204A	Espujo Espontáneo	Mucosa	1+
67	TAM	2-00206A	Espujo Espontáneo	Muco-Purulenta	3 BAAR en 100 campos observados
68	TAM	2-00210A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
69	TAM	2-00214A	Espujo Espontáneo	Salival	1+
70	TAM	2-00219A	Espujo Espontáneo	Muco-Purulenta	Negativo
71	TAM	2-00223A	Espujo Espontáneo	Muco-Purulenta	1+

72	TAM	2-00224A	Espujo Espontáneo	Mucosa	1+
73	TAM	2-00229A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
74	TAM	2-00231A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
75	TAM	2-00233A	Espujo Espontáneo	Salival	4 BAAR en 100 campos observados
76	TAM	2-00234A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
77	TAM	2-00236A	Espujo Espontáneo	Mucosa	3+
78	TAM	2-00249A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
79	TAM	2-00272A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
80	TAM	2-00273A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
81	TAM	2-00274A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
82	TAM	2-00285A	Espujo Espontáneo	Salival	4 BAAR en 100 campos observados
83	TAM	2-00291A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
84	TAM	2-00292A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
85	TAM	2-00298A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
86	TAM	2-00301A	Espujo Espontáneo	Salival	2 BAAR en 100 campos observados
87	TAM	2-00304A	Espujo Espontáneo	Salival	1+
88	TAM	2-00305A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
89	TAM	2-00309A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
90	TAM	2-00314A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
91	TAM	2-00320A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
92	TAM	2-00321A	Espujo Espontáneo	Salival	2+
93	TAM	2-00324A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
94	TAM	2-00327A	Espujo Espontáneo	Mucosa	3+
95	TAM	2-00331A	Espujo Espontáneo	Muco-Purulenta	3+
96	TAM	2-00332A	Espujo Espontáneo	Mucosa	Negativo
97	TAM	2-00337A	Espujo Espontáneo	Salival	2+
98	TAM	2-00347A	Espujo Espontáneo	Mucosa	1+
99	TAM	2-00352A	Espujo Espontáneo	Mucosa	3+
100	TAM	2-00354A	Espujo Espontáneo	Muco-Purulenta	3+
101	TAM	2-00361A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
102	TAM	3-00001A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
103	TAM	3-00002A	Espujo Espontáneo	Salival	3+
104	TAM	3-00003A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
105	TAM	3-00004A	Espujo Espontáneo	Salival	Negativo
106	TAM	3-00006A	Espujo Espontáneo	Salival	3+

Nota: TAM: Tamizaje

Anexo B. Resultado de cada muestra por cada uno de los métodos evaluados.

ID	Genotype 1L	MGIT	BK	LJ	TOTAL
1-00084A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00095A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00108A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00112A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00116A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00125A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00133A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00144A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00162A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00164A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00181A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00212A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00240A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00242A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00279A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00283A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00289A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00291A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00295A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00316A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00322A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00343A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00344A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00347A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00361A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00375A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00379A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00384A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00410A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00411A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00413A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00422A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00436A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00440A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00067A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00077A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00082A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00086A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00089A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00099A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4

ID	Genotype 1L	MGIT	BK	LJ	TOTAL
2-00105A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00204A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00214A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00233A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00272A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00273A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00291A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00298A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00304A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00305A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00321A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00327A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00331A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00337A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00347A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00352A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00354A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
2-00361A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
3-00001A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
3-00002A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
3-00006A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	4
1-00127A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
1-00129A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
1-00223A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
1-00243A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
1-00370A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
2-00224A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
2-00229A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
2-00301A	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	3
1-00210A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	3
1-00082A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	3
1-00117A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	3
1-00339A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	3
2-00074A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	3
2-00210A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	3
2-00231A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	3
2-00206A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	2
2-00223A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	2
2-00236A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	2
2-00285A	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	2
1-00298A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2

2-00309A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
ID	Genotype 1L	MGIT	BK	LJ	TOTAL
3-00003A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
3-00004A	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	2
2-00155A	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	2
2-00249A	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	2
2-00069A	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	2
1-00325A	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
1-00350A	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
1-00405A	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
2-00234A	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	1
1-00107A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	1
1-00152A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
1-00161A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
1-00191A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
1-00284A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
1-00369A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
1-00381A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00160A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00219A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00274A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00292A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00314A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00320A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00324A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
2-00332A	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	0
	89	81	74	72	

Anexo C. Tablas de contingencia y resultados de concordancia

Tabla de contingencia MGIT * LJ

		LJ		Total	
		Negativo	Positivo		
MGIT	Negativo	Recuento	21	4	25
		% del total	19.8%	3.8%	23.6%
	Positivo	Recuento	13	68	81
		% del total	12.3%	64.2%	76.4%
Total	Recuento	34	72	106	
	% del total	32.1%	67.9%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.604	.085	6.363	.000
N de casos válidos		106			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Tabla de contingencia BK * LJ

		LJ		Total	
		Negativo	Positivo		
BK	Negativo	Recuento	22	10	32
		% del total	20.8%	9.4%	30.2%
	Positivo	Recuento	12	62	74
		% del total	11.3%	58.5%	69.8%
Total	Recuento	34	72	106	
	% del total	32.1%	67.9%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.516	.090	5.320	.000
N de casos válidos		106			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Tabla de contingencia GENOTYPE_1L * LJ

			LJ		Total
			Negativo	Positivo	
Genotype 1L	Negativo	Recuento	15	2	17
		% del total	14.2%	1.9%	16.0%
	Positivo	Recuento	19	70	89
		% del total	17.9%	66.0%	84.0%
Total	Recuento	34	72	106	
	% del total	32.1%	67.9%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.476	.091	5.414	.000
N de casos válidos		106			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Tabla de contingencia BK * MGIT

			MGIT		Total
			Negativo	Positivo	
BK	Negativo	Recuento	20	12	32
		% del total	18.9%	11.3%	30.2%
	Positivo	Recuento	5	69	74
		% del total	4.7%	65.1%	69.8%
Total	Recuento	25	81	106	
	% del total	23.6%	76.4%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.594	.087	6.206	.000
N de casos válidos		106			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Tabla de contingencia GENOTYPE_1L * MGIT

		MGIT		Total	
		Negativo	Positivo		
Genotype_1L	Negativo	Recuento	15	2	17
		% del total	14.2%	1.9%	16.0%
	Positivo	Recuento	10	79	89
		% del total	9.4%	74.5%	84.0%
Total	Recuento	25	81	106	
	% del total	23.6%	76.4%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.647	.092	6.852	.000
N de casos válidos		106			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.

Tabla de contingencia GENOTYPE_1L * BK

		BK		Total	
		Negativo	Positivo		
GENOTYPE_1L	Negativo	Recuento	17	0	17
		% del total	16.0%	0.0%	16.0%
	Positivo	Recuento	15	74	89
		% del total	14.2%	69.8%	84.0%
Total	Recuento	32	74	106	
	% del total	30.2%	69.8%	100.0%	

Medidas simétricas

		Valor	Error típ. asint. ^a	T aproximada ^b	Sig. aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	.613	.085	6.843	.000
N de casos válidos		106			

a. Asumiendo la hipótesis alternativa.

b. Empleando el error típico asintótico basado en la hipótesis nula.