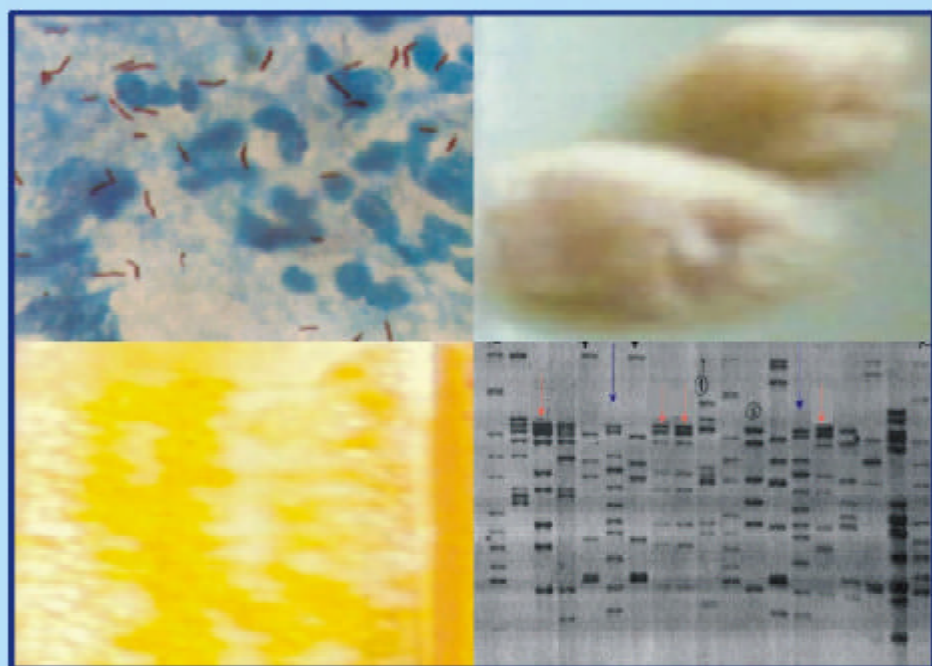


El Laboratorio de Salud Pública frente a la emergencia de la Tuberculosis Resistente



**Documento Técnico N°3
Enfermedades Emergentes y Reemergentes**

2001



EL LABORATORIO DE SALUD PÚBLICA FRENTE A LA EMERGENCIA DE LA TUBERCULOSIS RESISTENTE

Lima - Perú

2001

**Documento Técnico N° 3: Enfermedades Infecciosas Emergentes y
Reemergentes.**

Catalogación hecha por el Centro de Documentación e Información del INS

Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública (Lima)

El laboratorio de salud pública frente a la emergencia de la tuberculosis resistente / Centro Nacional de Laboratorios de Salud Pública.
— Lima : Ministerio de Salud : Instituto Nacional de Salud, 2001.

60 p. : il., diagrs. ; 21 cm. — (Documento Técnico. Enfermedades Emergentes y Reemergentes: Tuberculosis Resistente; 3)

Material para I Curso Internacional "Actualización en bacteriología de la tuberculosis, susceptibilidad de *M. Tuberculosis*, identificación de Micobacterias y avances en el diagnóstico de laboratorio" del 19 al 23 de Noviembre del 2001.

1. TUBERCULOSIS/diag 2. TUBERCULOSIS/clas 3. TUBERCULOSIS/epidemiol 4. INFECCIONES BACTERIANAS/normas 5.PERU 6.MANUALES

I. Instituto Nacional de Salud (Perú)
Perú. Ministerio de Salud

ISBN 9972 – 857 – 16 – 6

Hecho el Depósito Legal Nº 1501312001-4253

©Ministerio de Salud, 2001

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Telf.: 431-0410

©Instituto Nacional de Salud, 2001

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Telf.: 471-9920 Fax 471-0179

e-mail: postmaster@ins.sld.pe

Página Web: www.ins.sld.pe

Publicación aprobada con R.J. Nº 331 – 20 de noviembre 2001

Portada: Aspectos morfológicos y moleculares del *Mycobacterium tuberculosis*. Laboratorios de Micobacterias y Biología Molecular, INS.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I: SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS	
SITUACIÓN A NIVEL MUNDIAL	11
SITUACIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN EL PERÚ	13
EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO.....	15
APORTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN EL PERÚ	19
CAPÍTULO II: GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTE	
AGENTE ETIOLÓGICO	35
DIAGNÓSTICO	35
TIPIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS	47
PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSAS	59
BIBLIOGRAFÍA	66

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis, sigue constituyendo un problema de salud pública en el mundo, particularmente en los países en vías de desarrollo. En estos y aún en los países desarrollados la emergencia de la infección por VIH/SIDA ha agravado el panorama para su control efectivo.

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

El Perú no es ajeno a estos cambios del comportamiento epidemiológico de la enfermedad y de los cambios en el Micobacterium tuberculosis, por lo que el Instituto Nacional de Salud, cumpliendo su rol de dar soporte técnico - científico a las medidas de control de este daño, viene realizando investigaciones y brindando soporte al diagnóstico a través de la Red Nacional de Laboratorios en Salud Pública.

Como parte del proceso de transferencia tecnológica y el compartir experiencias con profesionales de países amigos y de la misma red nacional, se presenta este documento, que en su primera parte incluye aspectos epidemiológicos de la tuberculosis y los aportes del Instituto Nacional de Salud en los últimos años; y en una segunda parte se incluye una guía de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio para el estudio de la resistencia a medicamentos antituberculosos.

CAPÍTULO I

SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

SITUACIÓN A NIVEL MUNDIAL

La Tuberculosis (TB) fue declarada en 1993 como una «emergencia sanitaria mundial», debido a su magnitud como problema de salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los últimos tres lustros, el número de casos se ha incrementado en 20,0%, pasando de casi tres millones de casos anuales registrados en el período 1984-1986, a poco más de tres millones seiscientos mil casos en 1998. El número más elevado de casos se produjo en el año 1996, cuando fueron notificados a la OMS un total de tres millones ochocientos mil casos, sin embargo estas cifras no revelan la verdadera envergadura del problema, ya que se estima que en 1997 el número de casos fue cercano a 8 millones de personas.

Por tanto, es evidente que la TB es un problema creciente a nivel mundial, esto se refleja en la carga de morbilidad y mortalidad que representó en los últimos años. Para 1997, fue la primera causa infecciosa de mortalidad, estimándose que ocasionó tres millones de muertes; en 1998 pasó a un segundo lugar al registrar 2,8 millones de defunciones; y en 1999, la cifra llegó a tres millones.

Se ha reconocido que la TB está ligada a la pobreza, tal como lo evidencia su distribución a nivel mundial, siendo los países subdesarrollados los más afectados, no solamente por el número de casos, sino por las pérdidas en las horas de trabajo y en la productividad. La situación no es muy diferente en el llamado mundo industrializado, pues las desigualdades en los ingresos en vastos sectores de la población constituyen un terreno para la mayor prevalencia de la tuberculosis.

El panorama epidemiológico mundial se completa al considerar la magnitud de propagación que tiene este problema. Según estimaciones de la OMS, un tercio de la población mundial se encuentra infectada por el bacilo tuberculoso, con el consiguiente riesgo de reactivación de la infección por una serie de circunstancias.

Una nueva condición se ha constituido como parte de la epidemiología de la TB en el Perú y el mundo. Aunque la aparición epidémica del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tiene más de dos décadas, es recién en esta última década en que se ha hecho más evidente la asociación entre la infección por VIH y la afectación por TB. La coexistencia de estas dos entidades es cada vez mayor, toda vez que ambos agentes interactúan potenciándose mutuamente. La dinámica de esta interacción se sustenta en la reactivación de la infección tuberculosa por la inmunosupresión o la infección aguda que puede producirse a partir de exposiciones nuevas o reinfecciones. En forma recíproca, la tuberculosis, al activar la acción de los macrófagos, potencia la expresión del virus al acelerar la progresión hacia el estado SIDA.

La situación descrita coloca a la TB, junto a la Malaria y a la infección por el VIH, como los problemas infecciosos de mayor relevancia a nivel mundial.

Ante esta situación, la OMS, ha planteado en los últimos años el desarrollo de una serie de estrategias para controlar estos problemas. En el caso de la TB, se trata de la implementación de la estrategia del Tratamiento Acortado Directamente Observado –DOTS- por sus siglas en inglés. Dicha estrategia tiene como fin asegurar el cumplimiento del tratamiento, habiendo logrado resultados significativos en cuanto a la cobertura de tratamiento de la TB en numerosos países del mundo.

A pesar del avance significativo que representa la estrategia DOTS, así como los avances en la metodología diagnóstica, la tuberculosis está lejos de ser controlada y plantea progresivamente nuevos retos, tales como la multidrogorresistencia del bacilo tuberculoso y su asociación con la infección por VIH.

SITUACIÓN A NIVEL DE LAS AMÉRICAS

En las Américas, el comportamiento de la TB ha seguido el patrón de incremento registrado a nivel mundial. En el periodo 1984 - 1986, el promedio anual de casos registrados fue 227 277, observándose una disminución para el periodo 1989-1991 donde se registraron 207 790 casos. Posteriormente, se observó un aumento en el número de casos; en 1995, se reportaron 244 381 casos, y en 1996 se registró el mayor número de casos de los últimos quince años con 253 867 notificaciones, habiéndose producido una leve reducción en los años posteriores.

Si bien estas cifras pondrían a las Américas en el contexto global como una región de bajo riesgo, toda vez que dichas tasas son cerca de la mitad de los valores promedio para el resto del mundo, lo descrito no revela la verdadera magnitud del problema. Según estimaciones, una tercera parte de los casos nuevos no son notificados, en consecuencia, la cifra anual de casos para la región sería cercana a 400 000.

La distribución del problema en el interior de los países miembros de la región es heterogénea. En 1997, ocho países presentaron tasas mayores al promedio mundial, es decir mayor a 61 por 100 000 habitantes; entre estos se encuentran Ecuador, República Dominicana, Honduras, Nicaragua, Honduras, Perú, Haití y Bolivia; los tres últimos presentaron tasas de casos notificados superiores a los 100 por 100 000 habitantes. El resto de países presentaron tasas menores que llegan a valores tan bajos como en EEUU (7,3/100 000), Canadá (6,2/100 000) y Barbados (2,3/100 000). Cabe destacar que el país que reporta la mayor cantidad de casos en la región es Brasil. Este comportamiento, es básicamente el reflejo de la relación que existe entre la magnitud del problema y la existencia de niveles de pobreza elevados.

En 1998, la TB ocasionó 54 000 defunciones en la región, de las cuales el 98,2% ocurrieron en los países de medianos y bajos ingresos. En 1999, se estimó que hubo 59 000 fallecimientos a causa de la enfermedad. Con ello, la TB constituye la segunda causa infecciosa de mortalidad en la región, siendo únicamente superada por la infección por VIH-SIDA.

El panorama descrito tanto a nivel mundial como de la región, permiten establecer entonces que la TB se encuentra en ascenso, por lo que se le considera como una de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, siendo los factores que facilitan su propagación los siguientes:

- El crecimiento demográfico.
- La epidemia del VIH-SIDA.
- La situación socioeconómica imperante, que se caracteriza por la desproporción existente entre las necesidades y los recursos disponibles.
- Un gran desplazamiento poblacional generado por la presencia de guerras, desastres naturales y hambrunas regionales; y que han generado centros de población marginal urbana en donde el acceso a los servicios es limitado.
- La aparición de resistencia a las drogas tuberculostáticas.

SITUACIÓN DE LA TUBERCULOSIS EN EL PERÚ

LA MORBILIDAD POR TUBERCULOSIS EN EL PERÚ

La TB es un problema histórico en el Perú; se presume su existencia desde la época prehispánica, al haberse hallado evidencias de lesiones tuberculosas óseas en momias y en huacos que datan de esa época. Igualmente, los cronistas de la conquista describen la presencia de la enfermedad entre la población indígena y los colonos. El problema continuó durante la época republicana, considerándose en la década de los treinta como una hiperendemia (según datos de aquel periodo, la frecuencia llegó a valores de 400 por 100 000 habitantes).

La información epidemiológica existente revela que el comportamiento de la tuberculosis en las dos últimas décadas ha sido heterogéneo. En el año 1980, la tasa fue 92,4 por cien mil, en 1981 la tasa se incrementó hasta un 123,4 por cien mil y se mantuvo alrededor de esos valores hasta 1986. El ascenso en este periodo osciló entre un 28,0% y 34,0% en relación con la tasa observada en 1980. A partir de 1987, el comportamiento mostró una elevación constante de la morbilidad, llegando de una tasa de 157,7 por cien mil hasta 256,1 por cien mil en 1992. Durante este periodo, el

número de casos notificados por el programa de control osciló entre los 16 011 (en 1980), hasta los 38 597 casos (en 1989). El promedio anual de casos fue de 26 207 casos y la cifra más elevada correspondió a 1988 con 38 723 casos.

El incremento observado en la década de los ochenta se relaciona con el énfasis que tenía el programa de control de ese entonces, el cual obedecía a las directivas de la denominada época de la «quimioterapia y planificación en salud», y que se caracterizaba por la existencia de una estructura de dispensarios, hospitales y sanatorios, los que además de tener cobertura limitada, orientaban su accionar hacia la detección de casos, más no así para asegurar el cumplimiento del tratamiento. En dicho período, la cobertura de tratamiento para los casos detectados fue en promedio 36,0%.

La morbilidad a inicios de los 90 se encontraba en incremento, y se mantuvo sin mayores variaciones hasta el año 1993. A partir de 1994 se observó un descenso en la tasa de casos notificados, pasando de 227,9 por cien mil (1994) a 165,4 por cien mil (1999). Cabe destacar que en 1999 se registraron 41 730 casos, valor muy similar al observado al inicio de la década. En el año 2000 se notificaron 39 198 casos, lo que mantiene la tendencia de disminución de la TB en el país y nos devuelve a los valores registrados a finales de la década de los ochenta.

El comportamiento observado determinó que la TB fuera declarada como hiperendemia grave a inicios de la década de los 90. Esta situación generó una respuesta del sector que incorporó los lineamientos de control de la enfermedad propuestos por la OMS entre los años 1991 y 1993. Así, hubo dos momentos, uno de incremento marcado en los primeros cuatro años, y una disminución de las tasas en los últimos años. La respuesta del sector salud fue básicamente mejorar la detección de casos y asegurar el tratamiento para los pacientes diagnosticados.

En consecuencia, se observa que el Perú es un país con una elevada morbilidad por tuberculosis, sus tasas son tres veces mayores al promedio mundial, y aproximadamente, siete veces el valor de la tasa para la región de las Américas.

Con relación a la distribución geográfica de la TB en el interior del país, ésta es heterogénea. En la costa se observan las mayores tasas de morbilidad (Lima, Callao, Tacna, Ica y Moquegua), seguidos por dos departamentos de la selva (Madre de Dios y Ucayali). En 1998, el 55,5% de los casos de tuberculosis en todas sus formas se concentraron en las cinco DISAs del departamento de Lima, incluyendo la provincia Constitucional del Callao, y si se consideran las diez DISAs con mayor cantidad de casos, estas agruparían casi el 76,0% de los casos a nivel nacional. En contraste, las diez DISAs con menor cantidad de casos, solamente concentraron el 3,8% de las notificaciones. Para el año 2000, se observó una tendencia similar, en donde las DISAs de Lima concentran el 57,7% de los casos y las diez primeras DISAs reunieron

al 76,5% de todos los casos notificados al programa; igualmente, las diez direcciones con menor cantidad de casos, concentraron solamente el 3,2% de las notificaciones.

LA ASOCIACIÓN VIH/SIDA-TBC

En el Perú, se reconoció tempranamente la asociación entre el VIH y la tuberculosis. Al igual que en otras partes del mundo, el aumento de la frecuencia de la tuberculosis tuvo entre otras causas a la infección por el VIH. Desde 1997 se inició el estudio de la asociación a nivel de todas las DISAs con la finalidad de conocer la prevalencia notificada de la asociación VIH/SIDA-TB; para lo cual anualmente se aplica una encuesta en todas las DISAs. Como resultado de ello, se observó que la asociación se encuentra en un incremento constante en los últimos cuatro años, fundamentalmente debido al mayor número de casos nuevos y las recaídas que también muestran un comportamiento ascendente para el período. En ese sentido, los casos nuevos de asociación representan entre 73,0% a 78,0% de los casos registrados a nivel nacional, mientras que las recaídas representan entre 18,0% a 20,0%. Es importante destacar que la proporción con relación al total de casos se ha incrementado en forma progresiva, así en 1997 el total de casos de la asociación representó un 0,82% de los casos de TB, en 1998 esta proporción ascendió a un 1,0%, y en los dos años siguientes los casos representaron un 1,5% - 1,7% del total de casos de TB.

EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA AL TRATAMIENTO ANTITUBERCULOSO

La resistencia al tratamiento antituberculoso está relacionada a los abandonos de la terapia, las recaídas, los esquemas de tratamiento inadecuados y también a la aparición del VIH. Se describen patrones diversos en la resistencia a los medicamentos en relación con *Mycobacterium tuberculosis*. La nomenclatura habitual define la **Resistencia Primaria (RP)** cuando la cepa aislada es de un paciente sin tratamiento previo, y la **Resistencia Adquirida (RA)** cuando se trata de cepas provenientes de pacientes con un tratamiento previo.

La frecuencia de casos clínicos resistentes a antituberculosos de primera línea se ha incrementado substancialmente en el mundo entero en los últimos 20 años. En 1997,

la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Unión internacional de lucha contra la tuberculosis y enfermedades pulmonares, reportaron la prevalencia de la resistencia a isoniacida (INH), rifampicina (RFP), pirazinamida (PZA), y etambutol (EMB) en 35 países. En promedio, la RP a cualquier droga fue 9,9% y la multiresistencia primaria 1,4% .

El patrón para la resistencia más comúnmente observado involucró la resistencia a drogas en forma aislada, más notablemente a INH o estreptomycin (SM), drogas que han estado en uso durante varias décadas. Con la incorporación de RFP al tratamiento antituberculoso las tasas de éxito en el tratamiento alcanzaron hasta 95,0%. Sin embargo, progresivamente se establecieron nuevos patrones de resistencia; definiéndose en la actualidad a la Tuberculosis Multidrogorresistentes (MDR) como aquella con resistencia por lo menos a INH y RFP. Indiscutiblemente, el impacto máximo sobre las tasas de respuesta y la duración del tratamiento requerido está en función de la adquisición de resistencia a estas drogas mencionadas.

El Perú no es ajeno a dicha preocupante situación. Datos obtenidos a nivel nacional muestran una RP a por lo menos una droga de 15,4% en 1996, correspondiendo el 10,1 % a resistencia a una sola droga y 5,3% a más de una droga, asimismo, el patrón de resistencia por drogas cambia para la resistencia adquirida, donde la mayor frecuencia de RA global se observó para INH y RFP, siendo 23,8 y 20,3%, respectivamente.

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y MOLECULARES DE LA RESISTENCIA

En los últimos 10 años, con la aplicación de técnicas moleculares se ha logrado estudiar algunos de los aspectos de resistencia intrínseca a drogas. Así, el mecanismo de acción antimicrobiana de los agentes de espectro amplio sucede por la interacción con los sitios de acción típicos (inhibición de la ARN polimerasa en presencia de RFP, por ejemplo) como sucede en otras especies bacterianas.

Otro aporte de la biología molecular es el reconocimiento de la acumulación de mutaciones en los genes que codifican para los sitios blanco. En general, estas mutaciones pueden generar sitios de unión alterados o un cambio en la titulación de la droga. La INH interrumpe la producción de ácidos micólicos y, por lo tanto, las bacterias expuestas a la droga alteran su expresión de genes codificadores para enzimas involucradas en la vía biosintética del ácido micólico.

Recientemente, se han realizado estudios complejos que permiten identificar y cuantificar la expresión del ARN mensajero (ARNm) de los diferentes genes colocados en cambios mínimos del ADN, asimismo se pudo identificar otros procesos metabólicos que están sujetos a las consecuencias tóxicas de la droga.

En la actualidad se han descrito con bastante precisión las mutaciones que originan resistencia a los agentes de primera línea, sin embargo, aun existen controversias acerca de la forma en que se genera la resistencia múltiple. Los modelos matemáticos que predicen la resistencia parecen indicar que esta se genera por santuarios protectores del germen en los tejidos y no tanto por la acumulación de mutaciones que codifican la resistencia. Este concepto puede explicar como algunos pacientes bajo tratamiento adecuado, desarrollan resistencia particularmente mono resistencia a rifampicina, y de manera similar pudiera explicar el por qué más de 2 drogas para el tratamiento de la TB.

Detección molecular de la multidrogoresistencia

La detección de bacilos resistentes a drogas se basa en metodologías convencionales tales como cultivo, los que toman mucho tiempo en la emisión de sus resultados. Debido a que existe una gran necesidad de contar con métodos de detección rápidos y confiables de la resistencia a las drogas antituberculosas que puedan llevar a tratamientos eficientes y que lleguen a consolidar un control más efectivo de la enfermedad en el país, actualmente se cuenta con el sistema BACTEC, cuyo resultado satisfactorio puede revelarse en 7 días en las mejores condiciones, pero con el inconveniente que su costo es muy elevado.

Mecanismo molecular de resistencia a drogas antituberculosas

RFP e INH son componentes importantes de la terapia efectiva contra la TB. Sus mecanismos de acción involucran la inhibición de la ARN polimerasa, la síntesis de ácido micólico y la actividad catalasa-peroxidasa, bloqueando así el crecimiento bacteriano. La resistencia a la RFP es el resultado de mutaciones que ocurren en una discreta región central del gen *rpoB*, las cuales dirigen la unión defectiva de la droga con la enzima, y de esta forma provocan la resistencia. Por otro lado, la resistencia a isoniazida está asociada con una variedad de mutaciones que afectan por lo menos a uno de los genes *katG* (catalasa-peroxidasa), *inhA* (síntesis ácido micólico) y *ahpC* (alquil-hidroperóxido reductasa) [Rattan y col., 1998].

Detección de mutaciones en los genes responsables

Gracias al desarrollo de la biología molecular se han llegado a identificar las mutaciones responsables de la resistencia a INH y RFP, las cuales se hacen imperceptibles con

los métodos clásicos. Las mutaciones puntuales pueden detectarse mediante la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis conformacional electroforético. Entre ellos, el PCR-SSCP se basa en la variación de la movilidad electroforética de las hebras simples o desnaturalizadas de ADN. Una mutación puntual genera la alteración de la estructura secundaria del ADN y varía su movilidad electroforética, dando lugar a patrones característicos. Asimismo, el método Heteroduplex analiza las alteraciones en dobles hebras ocurridas por apareamientos incorrectos al existir hibridación entre genes sensibles y mutantes que igualmente reflejaran alteraciones en la movilidad electroforética [William y col., 1994; Prosser, 1993].

Existen otros métodos alternativos mundialmente usados para la detección de la resistencia a drogas en *M. tuberculosis*. El Lip A, es un método basado en hibridación reversa para detectar resistencia a RFP, aunque su costo es elevado. A pesar de ello, viene siendo muy utilizado, pero emite diferentes resultados, los cuales son dependientes de las características de la población infectada. Bartfai, así como otros autores consideran que la aplicabilidad de este método debe ser precedido por una validación, ya que puede detectar mutaciones silenciosas con mínimas implicaciones en la susceptibilidad antibiótica y emitir resultados equivocados.

APORTES DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN EL PERÚ

En el marco de las estrategias de la lucha contra la tuberculosis, es importante que el Ministerio de Salud cuente con capacidades para el diagnóstico, así como para la evaluación de la resistencia a medicamentos antituberculosos.

En ese sentido el INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS) a través de la Red Nacional de Laboratorios, juega un rol importante en la implementación de los laboratorios de la red, la capacitación de los recursos humanos, y el control de calidad efectivo de los procedimientos diagnósticos (Figura 1).

RED NACIONAL DE LABORATORIOS EN SALUD PÚBLICA

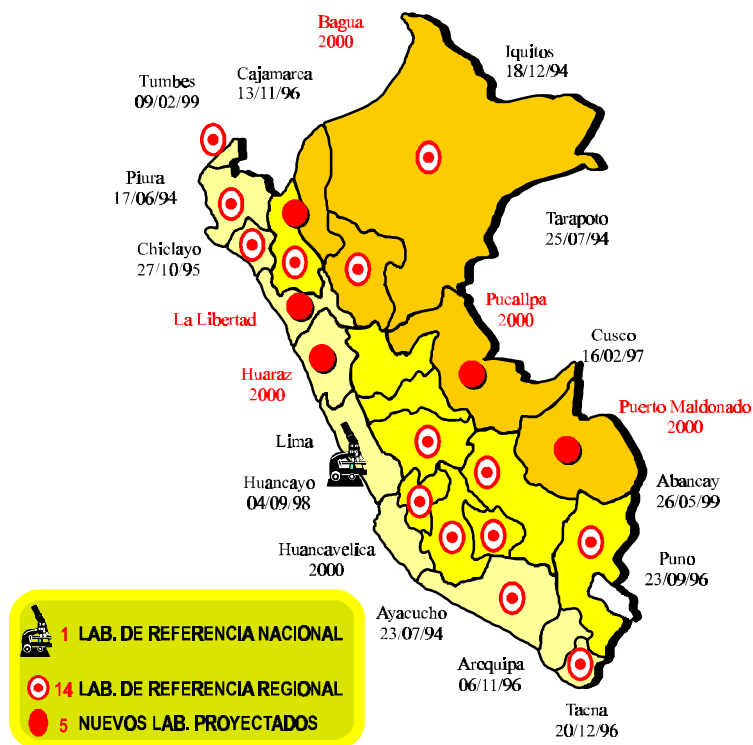


Figura 1. Mapa de la Red Nacional de Laboratorios.

Actualmente, la Red Nacional de Laboratorios, cuenta con alrededor 1200 laboratorios de nivel local que realizan el diagnóstico de tuberculosis mediante la baciloscopia y mas de 70 a nivel nacional que además realizan cultivo y control de calidad de las baciloscopias. El Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del INS, es el ente referencial para el control de calidad no solo de la baciloscopia, sino también de los medios de cultivo de los laboratorios que lo preparan. En este laboratorio de referencia se realizan las pruebas de sensibilidad a drogas antituberculosas de primera línea utilizando el método convencional (proporciones) y por sistema semiautomatizado BACTEC 460TB, pasando además estas pruebas de sensibilidad por un riguroso control de calidad internacional, habiéndose logrado en el mismo una muy alta sensibilidad y especificidad por drogas y una concordancia del 100,0% de las pruebas para el 2000 (realizado por el INPPAZ-Buenos Aires).

Desde 1993-94, el INS realiza estudios de resistencia, habiéndose iniciado con un estudio piloto de Vigilancia de resistencia primaria (RP) a drogas, y es a partir de 1995-1996, que la OMS incluye al Perú en su programa Global de Vigilancia de resistencia, en cuyo marco se ejecutó el primer estudio nacional de manera conjunta entre el INS y el Programa Nacional de Control de la Tuberculosis (PCT), hallándose cifras de RP de 15,4%, MDRP de 2,4%, RA de 36,0%, y MDRA de 15,7%, habiéndose recomendando volver a realizar el mismo en 4 años.

Como resultado de estos estudios en Octubre de 1997, el PCT instauró un tratamiento referencial para multidrogosresistentes, el cual dura 18 meses y consta de cicloserina, kanamicina, ethionamida, etambutol y pirazinamida (CICLS, KM, ETHIO, EMB y PZA) por 3 meses y CICLS, ETHIO, EMB y PZA por 15 meses.

En 1999, se realizó un segundo estudio enmarcado en la Vigilancia de resistencia a drogas antituberculosas, con el cual el Perú, se constituyó en una de las 24 áreas geográficas del mundo que provee datos de prevalencia de casos nuevos de tuberculosis. Este estudio mostró significativamente alta proporción de resistencia si se compara con el estudio anterior, habiéndose encontrado 18,0% de RP en 1879 casos nuevos de TB.

Por otro lado se está iniciando la vigilancia y monitoreo de la asociación TBC/SIDA, como un factor que incrementa la TBC y la MDR. En 1998, un estudio hecho en todos los casos que llegaban al INS, los valores de RA y RP fueron más altos que los no coinfectados.

Desde el año 2000, dentro del marco de vigilancia de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, se viene implementando un sistema de información para laboratorios de salud pública denominado PHLIS (Public Health Information System), el cual servirá para apoyar al control de la TB y otras enfermedades, brindando una información oportuna y de calidad a través de la Red Nacional de Laboratorios.

A continuación, se presentan algunas de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional de Salud:

ESTUDIO 1: EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS ENTRE 1995 Y 1996.

Durante este periodo, se evaluaron 1958 casos procedentes de 31 Sub-Regiones de Salud del país, donde se determinó la resistencia del *Mycobacterium tuberculosis* a los medicamentos. Para este fin se utilizaron los métodos de Petroff y de Ogawa Kodoh en el aislamientos del germen, y para la evaluación de la sensibilidad el método de proporciones de Canetti, Rist y Grosset.

Se evaluaron las siguientes drogas: INH, RFP, SM, y EMB. El 50,0% de las pruebas de sensibilidad fueron realizados en el Laboratorio de Referencia del INS, y el restante en tres laboratorios de la red implementados y capacitados.

La co-infección por VIH se documentó en 6 de los casos sin tratamiento previo (0,4%), y 3 de los casos tratados previamente (0,8%).

Los resultados de resistencia primaria (RP) y resistencia adquirida (RA) de los 1958 casos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Resistencias inicial, adquirida y total a medicamentos antituberculosos. INS-Perú, 1996.

RESISTENCIA AL MEDICAMENTO	Primaria (n= 1 500)		Adquirida (n= 458)		Total (n= 1 958)	
	n	%	N	%	N	%
Isoniazida	113	7,5	109	23,8	222	11,3
Rifampicina	69	4,6	93	20,3	162	8,3
Estreptomicina	131	8,7	79	17,2	210	10,7
Etambutol	24	1,6	28	6,1	52	2,7
Uno o más medicamentos	231	15,4	165	36,0	396	20,2

Por otro lado, se identificó multidrogorresistencia (MDR) en 2,5% (38/1500) de los casos sin tratamiento previo, y en 15,1% (68/458) de los casos tratados previamente.

Los resultados de la resistencia según la procedencia de las regiones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resistencia primaria y adquirida (RP) y (RA) a medicamentos antituberculosos, de acuerdo a la región. INS - Perú, 1996.

Región	No tratados previamente					Antes tratado				
	Resistencia primaria			Multiresistencia		Resistencia primaria			Multiresistencia	
	N	N	%	N	%	N	N	%	n	%
Lima y Callao	873	123	14,1	23	2,6	235	76	32,2	26	11,0
Provincias	627	106	16,9	14	2,2	223	86	38,5	46	21,5
Total	1500	229	15,3	37	2,5	458	162	36,0	72	15,7

ESTUDIO 2: PREVALENCIA DE LA RESISTENCIA A MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS, 1999.

Con el fin de evaluar la resistencia a medicamentos antituberculosos, se incluyeron en el estudio 2101 casos de TB pulmonar con frotis positivo (técnica de Ziehl Neelsen), procedentes de todas las DISAs del país (38 conglomerados). De estos casos, 260 (12,4%) tenían el antecedente de tratamiento previo.

Los laboratorios locales e intermedios de la red de laboratorios realizaron el examen directo, mientras que laboratorios regionales realizaron los aislamientos por los métodos Petroff en medio Lowenstein – Jensen o método de Ogawa en medio de Ogawa. Las pruebas de sensibilidad (PS) por el método de las proporciones a 4 drogas de primera línea (isoniacida (INH), estreptomycin (SM), etambutol (EMB) y rifampicina (RFP)) fueron realizadas por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNRN) y 3 laboratorios más, bajo la dirección y control de calidad del INS y del Instituto Nacional Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ/OPS/OMS).

La distribución de los grupos etáreos en este estudio se muestra en la figura 2, siendo la más afectada los grupos de 15 a 34 años (la población económicamente activa).

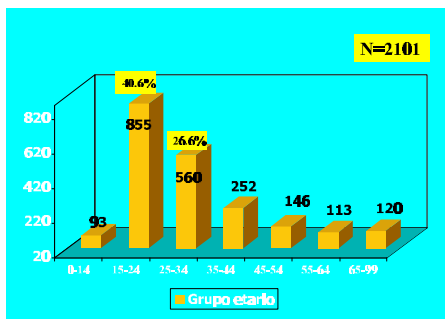


Figura 2. Distribución por grupos etáreos. Perú - INS. 1999.

De los 1841 pacientes sin tratamiento previo el 17,8% presentó RP a 1 o más medicamentos, en tanto la RA de 260 pacientes tratados previamente fue 23,5%.

La MDR primaria alcanzó 3,0% y la MDR adquirida fue 12,3% (Figura 3). La RP a una o más drogas fue mayor para SM (11,8%), seguida de INH (8,8%), RFP (4,0%) y EMB (2,6%); mientras que la RA a una o más drogas fue mayor para INH (16,2%), seguida por RFP (14,6%), SM (12,7%) y EMB (5,4%).

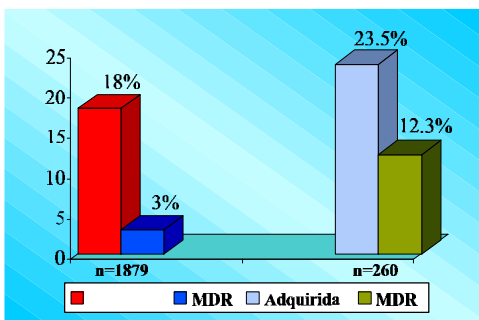


Figura 3. Multidrogo-resistencia (MDR) primaria y adquirida, Perú - INS. 1999.

Al comparar los resultados de los estudios 1 y 2, realizados por el INS en 1999 y 1995, respectivamente, se evidencia que la RP se incrementó tanto para drogas únicas como asociadas; sin embargo, se observa una disminución en los valores de RA en los mismos grupos.

En la Figura 4 se puede observar la composición de la muestra de los estudios de 1995 y 1999.

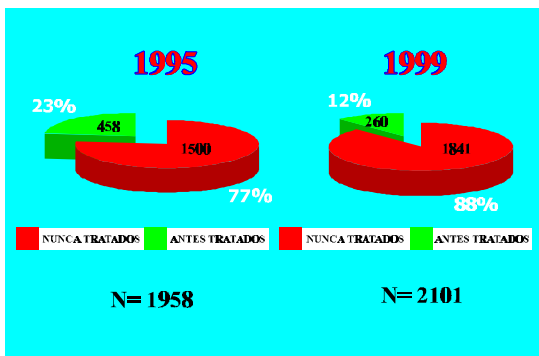


Figura 4. Composición de la muestra, Perú - INS.
Cuadro comparativo. Estudios 1995 y 1999.

La resistencia primaria (RP) global encontrada en los estudios de 1999 y 1995 se muestran en la figura 5, mostrándose un aumento estadísticamente significativo.

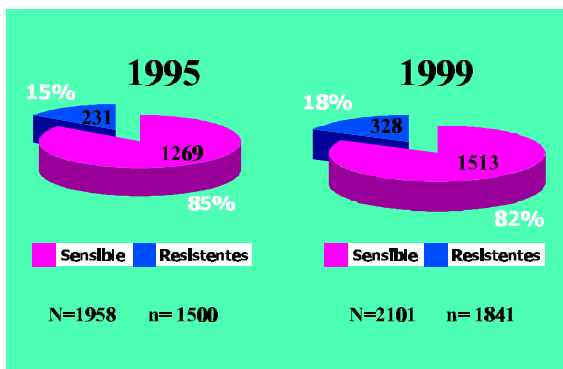


Figura 5. Resistencia Primaria a medicamentos antituberculosos, Perú - INS.
Cuadro comparativo. Estudios 1995 y 1999.

La resistencia adquirida (RA) global encontrada en el estudio de 1999 de pacientes con antecedentes de tratamiento fue 23,5%, a diferencia con el estudio de 1995 que fue 36,0% (Figura 6).

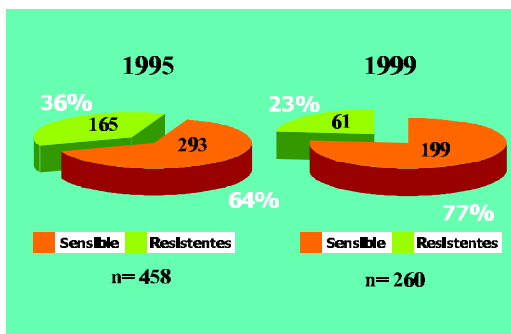


Figura 6. Resistencia Adquirida a medicamentos antituberculosos, Perú - INS.
Cuadro comparativo. Estudios 1995 y 1999.

La MDR, es decir la resistencia simultánea a isoniacida (INH) y rifampicina (RFP) en pacientes nuevos sin tratamiento previo fue 3,0% en el estudio de 1999, mayor al 2,4% del estudio de 1995. En tanto, que la MDR adquirida demostrada en el estudio de 1999 fue 12,3%, mientras que en 1995 fue 15,7%.

En 1999, la RP global por drogas para SM fue 12,0%, INH 9,0%, EMB 3,0%, y RFP 4,0%. En los tres primeros las cifras son mayores a los valores de 1995, y en la última ligeramente menor (Figura 7).

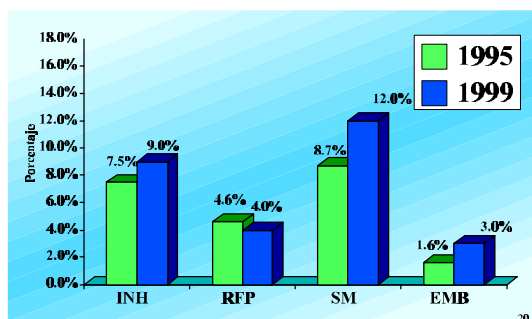


Figura 7. Resistencia primaria por drogas a medicamentos antituberculosos, Perú - INS.
Cuadro comparativo. Estudios 1995 y 1999.

La RA global por drogas, en el estudio de 1999, para INH fue 16,0%, RFP 15,0%, SM 13,0% y EMB 0,7%; en todos los casos fueron inferiores a los encontrados en 1995.

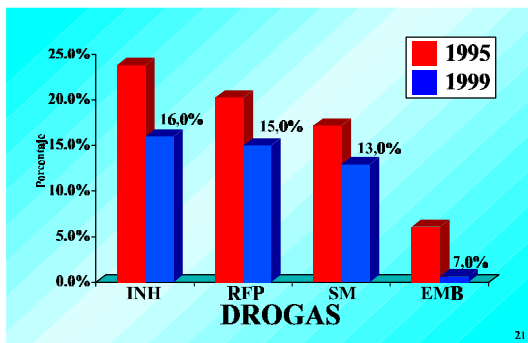


Figura 8. Resistencia adquirida por drogas a medicamentos antituberculosos, Perú - INS. Cuadro comparativo. Estudios 1995 y 1999.

Luego de comparar los hallazgos de los estudios de 1995 y 1999, podemos concluir que:

- La resistencia primaria (RP) global (17,8%) encontrada en el estudio 1999, es mayor que la registrada en 1995 (15,4%).
- La resistencia adquirida (RA) global en 1999 fue 23,5%, menor que la encontrada en el estudio 1995 que fue 36,0%.
- La MDR primaria de 3,0% registrada en el estudio 1999, fue mayor que 2,5% encontrada en 1995 y MDR adquirida de 12,3% encontrada en el estudio 1999, fue menor que 15,7% registrada en 1995.
- La RP por drogas en 1999 fue más alta para estreptomocina 12,0% seguida por isoniacida 9,0%, rifampicina 4,0%, y etambutol 3,0%.
- La RA por drogas en 1999 fue más alta para isoniacida 16,0%, rifampicina 15,0%, estreptomocina 13,0% y etambutol 0,7%.
- El 66,0% de los casos estudiados estuvieron entre los grupos etareos de 15 a 34 años, el 4,0% fue menor de 14 años y el 30,0% entre 35 a 90 años.

ESTUDIO 3: MICOBACTERIAS EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH/SIDA EN LIMA Y CALLAO

Este estudio se realizó en cinco hospitales de Lima y Callao con el objetivo de determinar la frecuencia de micobacterias tuberculosas y no tuberculosas en pacientes coinfectados VIH-TB, así como la susceptibilidad a drogas antituberculosas.

Se efectuó entre marzo de 1998 y febrero de 1999, habiéndose procesado muestras pulmonares y extrapulmonares provenientes de pacientes con infección por VIH/SIDA. 156 aislamientos en medio Ogawa fueron recepcionados en el Laboratorio de Referencia de Micobacterias del INS, correspondiendo 132 (84,6%) a muestras de esputos, 3 (1,9%) orina, 2 (1,3%) heces, 12 (7,7%) secreción ganglionar, 1 (0,6%) biopsia ganglionar, 1 (0,6%) líquido pleural, 1(0,6%) absceso sub cutáneo, 2 (1,3%) aspirado gástrico y 2 (1,3%) líquido cefaloraquídeo.

La tipificación se basó en las características culturales de las colonias, velocidad de crecimiento y las pruebas bioquímicas: niacina y nitrato reducción. La susceptibilidad se realizó por el método de las proporciones para isoniacida, estreptomina, etambutol y rifampicina; y método enzimático de Wayne para la pirazinamida.

Los pacientes fueron clasificados en dos grupos: 105 (67,3%) sin tratamiento previo y 51(32,6 %) con antecedentes de tratamiento.

De los 156 aislamientos identificados todos correspondieron a *M. tuberculosis*. La resistencia a una o más drogas en el grupo de pacientes sin tratamiento previo fue 58,1% y la MDR fue 28,6%. La resistencia en los tratados previamente fue 82,3% y la MDR fue 60,7%. (Tablas 3-5). Se concluyó que la resistencia y la MDR fueron elevadas en este grupo de pacientes en comparación con los pacientes sólo con enfermedad tuberculosa.

Tabla 3. Resistencia Primaria y Adquirida en Pacientes Co-infectados VIH-TB. INS - Perú. 1998.

Pacientes	Nº	RI %	MDR %
Sin tratamiento previo	61/105	58,1	28,6
	Nº	RA %	MDR %
Tratados previamente	42/51	82,3	60,7

RI = Resistencia Inicial RA = Resistencia Adquirida
MDR = Multidroga Resistente

Tabla 4. Resistencia Primaria por drogas en pacientes coinfectados VIH-TB. INS - Perú. 1998.

Características	Drogas	Aislamiento	(%)
A UNA DROGA:	INH	5	4,8
	SM	10	9,5
	EMB	4	3,8
	RFP	4	3,8
	PZA	0	0,0
SUB TOTAL:		23	22,0
A DOS DROGAS:	INH - RFP	6	5,7
	INH - SM	2	1,9
	SM - RFP	1	0,9
	SM -EMB	1	0,9
	EMB - PZA	1	0,9
SUB TOTAL:		11	11,0
A TRES DROGAS:	INH - SM- PZA	1	0,9
	INH - SM - RFP	6	5,7
	INH - SM - EMB	2	1,9
	INH - EMB - RFP	2	1,9
	INH - RFP - PZA	8	7,6
SUB TOTAL:		19	18,0
A CUATRO DROGAS:	INH-EMB-RFP-PZA	1	0,9
	INH-SM-EMB-RFP	3	2,9
	INH-SM-RFP-PZA	2	1,9
SUB TOTAL:		6	5,7
A CINCO DROGAS:	INH-SM-EMB-RFP-PZA	2	1,9
RESISTENTES:		61	58,0
SENSIBLES:		44	42,0
TOTAL:		105	100,0

Isoniacida=INH, Estreptomocina=SM, Ethambutol=EMB, Rifampicina=RFP

Pirazinamida=PZA

FUENTE: LAB. MICOBACTERIAS /INS

Tabla 5. Resistencia adquirida por drogas en pacientes
Co-infectados VIH-TB. INS - Perú. 1998.

Características	Drogas	Aislamiento	(%)
RESISTENTE:			
A UNA DROGA	INH	1	1,9
	SM	2	3,9
	RFP	2	3,9
SUB TOTAL:		5	9,8
A DOS DROGAS	INH - RFP	4	7,8
	INH - SM	4	7,8
	SM -EMB	1	1,9
SUB TOTAL:		9	18,0
A TRES DROGAS:	INH - RFP- PZA	1	1,9
	SM - EMB - RFP	1	1,9
	INH - SM - RFP	4	7,8
SUB TOTAL:		6	12,0
A CUATRO DROGAS:	INH-EMB-RFP-PZA	1	1,9
	INH-SM-EMB-RFP	3	5,9
	INH-SM-RFP-PZA	6	1,9
SUB TOTAL:		10	20,0
A CINCO DROGAS:	INH-SM-EMB-RFP-PZA	12	24,0
RESISTENTES:		42	82,0
SENSIBLES:		9	18,0
TOTAL:		51	100,0

Isoniacida=INH, Estreptomina=SM, Ethambutol=EMB, Rifampicina=RFP
Pirazinamida=PZA

FUENTE: LAB. MICOBACTERIAS /INS

ESTUDIO 4: CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE *Mycobacterium tuberculosis*. INS - PERÚ, 2000.

En el año 2000, con el objetivo de conocer la sensibilidad de los medios de cultivo y la calidad de los cultivos realizados por los diferentes laboratorios de la Red de Laboratorios, se evaluó el material enviado por dichos laboratorios (cada laboratorio envió una muestra de 10 tubos).

Para el análisis de resultados se estableció el límite control (LC), realizando la sumatoria del recuento de las colonias desarrolladas en los diez tubos; y el límite inferior (LI) se determinó calculando la media de control menos dos desviaciones estándar. Los medios de cultivo cuyo promedio de recuento de colonias resultó entre el LC y el LI fueron considerados como de calidad aceptable, y los medios cuyo promedio de recuento de colonias resultó menores que el LI fueron calificados como de calidad no aceptable.

De los 47 laboratorios incluidos en el estudio sólo 32 (68,0%) enviaron sus muestras. Resultaron con calidad aceptable 26 de los 32 medios (81,0%). Los factores identificados que influyeron en la calidad del medio fueron: calidad de los insumos, coagulación deficiente, temperatura excesiva, pH del medio, y falta de coaguladores y otros equipos necesarios en algunos laboratorios, así como el mantenimiento de equipos en otros.

APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

Genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* y su uso en estudios de transmisión: Marcadores genéticos como identificadores cepa-específico

Los primeros esfuerzos para diferenciar entre distintos aislamientos de *M. tuberculosis* fueron realizados en base a sus diferencias fenotípicas. Se desarrollaron métodos bioquímicos, serológicos, métodos basados en el patrón de susceptibilidad a antibióticos o la susceptibilidad a ciertos fagos. Sin embargo, en todos ellos, la limitada variación entre las cepas era el principal problema. Posteriormente con la emergencia de los métodos moleculares se desarrollaron técnicas basadas en múltiples secuencias repetitivas de ADN (IS6110, IS1081, DRE, PGRS, MPTR, VNTR, ERIC, etc) las cuales se distribuyen a lo largo del genoma en número y posición variable, generándose de esa forma patrones distintos que pueden distinguir entre diferentes cepas de *M. tuberculosis* [Suffys y col., 1997].

La mayoría de estudios de genotipificación se han enfocado en la secuencia de inserción 6110 (IS6110) como el principal marcador genético. Desde que se propuso

un protocolo estándar basado en la restricción enzimática e hibridación (RFLP-IS6110), este ha sido usado por muchos laboratorios en todo el mundo en estudios de Epidemiología Molecular, en el cual se emplean métodos moleculares en conjunción con métodos epidemiológicos convencionales para caracterizar las cepas de *M. tuberculosis* y estudiar la dinámica de la TB [van Embden y col., 1993].

¿Cómo la Epidemiología Molecular ha cambiado nuestro conocimiento sobre la tuberculosis?

Los estudios de Epidemiología Molecular en TB pueden estar enfocados desde dos puntos de vista. Primero, puede emplearse para confirmar y caracterizar brotes epidémicos de TB, es decir, para confirmar la presencia de una misma cepa en un grupo de pacientes y reconstruir la cadena y los eventos de transmisión. Segundo, y tal vez la aplicación más valiosa, la identificación de grupos de transmisión desconocidos en una determinada población. Mediante estudios poblacionales es posible determinar los patrones de transmisión, los grupos mayoritarios de pacientes en donde la transmisión activa está ocurriendo y los factores de riesgo asociados a dicha transmisión activa. Es posible, también, determinar el impacto de la transmisión activa vs. la reactivación endógena de infecciones latentes en los casos nuevos de tuberculosis en una determinada localidad [Alland y col., 1994; Small y col., 1994] y estudiar la transmisión de cepas sensibles o resistentes ampliamente diseminadas o altamente transmisibles, como la cepa “W” en Nueva York, o la “familia Beijing” en países orientales [van Soolingen y col., 1995, Agerton y col., 1999].

Asimismo, los métodos de genotipificación han documentado la reinfección exógena con una nueva cepa de *M. tuberculosis* como una causa de recaída en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos, así como casos de TB activa ocasionado por infecciones múltiples de cepas de *M. tuberculosis* con distinto patrón genético [Kato-Maeda y col., 2000].

La Epidemiología Molecular ha permitido derrumbar viejos paradigmas y dogmas pre-establecidos. Por ejemplo, se ha demostrado que los casos frotis-negativos, los cuales eran ignorados por los programas de control, no sólo son capaces de transmitir la enfermedad; sino tiene un impacto considerable en la transmisión activa, alrededor del 17% en San Francisco [Behr y col., 1999].

El vertiginoso desarrollo y la disponibilidad de una amplia variedad de nuevas tecnologías en Genética y Biología Molecular representan un enorme aporte en la lucha contra las enfermedades que aquejan a la humanidad, y tienen un impacto sobre el conocimiento de las enfermedades infecciosas y el diseño de nuevas estrategias para combatirlas.

Recogiendo las recomendaciones de la OMS, la doctrina para el Control de la TB en el Perú está basado principalmente en tres objetivos: 1) Diagnosticar al 70 % de enfermos con TB pulmonar bacilífera, 2) Curar al 85% de ellos y, 3) Vacunar con BCG al menos al 90% de recién nacidos [MINSA 2000]. Adicionalmente, es ampliamente conocido que el diagnóstico temprano y un adecuado entendimiento de la dinámica de la transmisión contribuyen enormemente en interrumpir con efectividad la cadena epidemiológica de la transmisión de la TB [Warren P y col., 1999].

En este contexto, los principales retos en la investigación y desarrollo en Biología Molecular para combatir la tuberculosis son: En primer lugar, la implementación de nuevas herramientas que puedan servir para acortar el tiempo entre la captación del sintomático respiratorio, el diagnóstico, y el inicio del tratamiento; y, en segundo lugar, el desarrollo de estudios de epidemiología molecular que contribuyan en determinar la dinámica de la transmisión y la patogénesis de la TB en el Perú.

El Instituto Nacional de Salud como entidad rectora de la investigación en el país viene desarrollando proyectos de investigación para implementar métodos moleculares que puedan servir como herramientas útiles en la investigación y control de la tuberculosis.

Por un lado, se está implementando un sistema de detección de la resistencia a las dos principales drogas antituberculosas, utilizando las metodologías establecidas por Telenti y col., [1997] y Williams y col., [1994], basados en la detección de mutaciones genéticas responsables de la resistencia a rifampicina e isoniacida. Se ha evaluado la sensibilidad del método, detectando hasta 5 ng. de ADN genómico total de esputo de pacientes con baciloscopia positiva. Además de ello también se evaluó la especificidad del método usando ADN genómico de *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* sin obtenerse productos de amplificación [Calderón y col., 2001].

Por otro lado, se ha establecido el sistema de genotipificación basado en la secuencia de inserción IS6110 de acuerdo al protocolo de van Soolingen y col (1993). Se evaluó la reproducibilidad de la metodología ensayando una cepa de referencia en 5 repeticiones independientes, los cuales produjeron un mismo patrón genético. Se estudio, también, de manera preliminar su aplicabilidad en dos grupos de casos de tuberculosis [Baldeviano y col., 2001].

El siguiente paso es validar el método de detección temprana de resistencia a drogas en un ensayo con un adecuado diseño, tamaño muestral, espectro de pacientes y diversas fuentes de muestra. Asimismo, se vienen desarrollando proyectos de investigación en epidemiología molecular para estudiar la transmisión de la tuberculosis en pacientes con coinfección VIH/TB y pacientes MDR, como también, estudios poblacionales en comunidades con alta prevalencia de TB ("bolsones de tuberculosis").

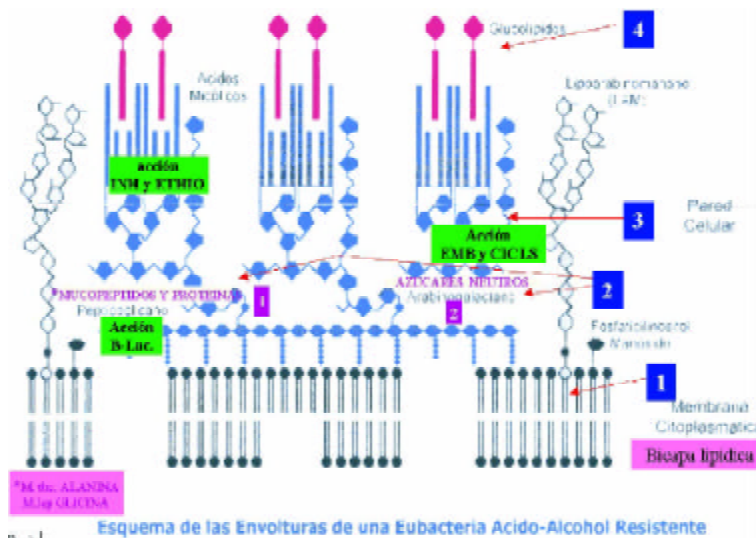
CAPÍTULO II

GUÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DEL *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTE

AGENTE ETIOLÓGICO

El *M. tuberculosis* es un microorganismo de forma bacilar, de longitud de 2 a 4 micras y diámetro 0,2 a 0,5 micras. Su pared celular está compuesta por lípidos (más del 60,0%), glicolípidos y proteínas. La presencia de ácidos micólicos son típicos de este bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) (Figura 9).

Estos gérmenes son no esporulados, no móviles, aerobios y de replicación binaria cada 18 a 20 horas.



INH=ISONIACIDA, ETHIO=ETIONAMIDA, EMB=ETAMBUTOL,
CICLS=CICLOSERINA, B-LAC.=B-LACTAMICOS
FUENTE: Copyright Linda M. Stannard.

Figura 9. Pared celular micobacteriana.

DIAGNÓSTICO

DIAGNÓSTICO POR MÉTODOS CONVENCIONALES (CULTIVO)

Entre los métodos bacteriológicos utilizados para el diagnóstico de la TB tenemos la baciloscopia y el cultivo de Micobacterias, siendo éste último más sensible y específico.

Investigaciones realizadas muestran que para aislar *M. tuberculosis* de 1 mL de muestra (pulmonar o extrapulmonar) es necesario solo la presencia de 10 bacilos, mientras que para tener un frotis positivo con la coloración de Ziehl-Neelsen se necesita tener entre 5000 a 10000 bacilos ácido alcohol resistentes por mL de muestra.

La importancia del cultivo radica en aislar *M. tuberculosis* a partir de muestras de escasa cantidad de bacilos (paucibacilares) en pacientes con sospecha de TB y radiografía anormal. También es de gran importancia en el diagnóstico de la TB infantil y en pacientes con VIH/SIDA, a fin de realizar la identificación de la cepa y para la realización de las pruebas de sensibilidad a los medicamentos antituberculosos.

Los medios de cultivo para el aislamiento de *M. tuberculosis* incluyen medios sólidos que contienen proteínas del huevo, (medio Lowenstein-Jensen y medio de Ogawa), cuyos ingredientes como la L-asparagina y el ácido glutámico respectivamente son utilizados como fuente de nitrógeno, y la glicerina como fuente de carbono. Ambos utilizan el colorante verde de malaquita como inhibidor de la flora asociada. Entre los medios líquidos se encuentran el MGIT, BACTEC.

Método de OGAWA

- En una cabina de bioseguridad, colocar las muestras debidamente rotuladas en una bandeja.
- Trasvasar 1 mL de muestra de esputo a un tubo de 25x150 tapa rosca estéril.
- Agregar 4 mL de NaOH al 4 %.
- Poner los tubos en estufa o baño maría a 37 °C por 20 minutos.
- Retirar los tubos de la estufa o baño maría y homogenizar.
- Inocular 0,1 mL en cada uno de los tubos con medio Ogawa, tratando de bañar toda la superficie del medio.
- Colocar los tubos con la tapa ajustada, inclinados en una bandeja.
- Incubar en estufa a 37°C.
- Revisar los cultivos a las 48 y 72 horas para observar si existe contaminación.
- Realizar la lectura a los 7, 15, 30 y 60 días respectivamente.

Método de PETROFF-Lowenstein - Jensen

- Colocar las muestras numeradas en orden correlativo sobre la mesa de trabajo, poner en una gradilla igual cantidad de tubos estériles numerados con la misma secuencia de las muestras.
- Trasvasar a cada tubo 2 ml de la muestra de esputo o de suspensión obtenida por macerado y en caso de muestras centrifugadas emplear todo el sedimento

(se recomienda utilizar pipetas pasteur de 3 mm de diámetro y longitud aproximada de 28 cm, provistos de pro-pipetas de jebes para trasvasar las muestras).

- Agregar a cada tubo 4 mL de solución estéril de hidróxido de sodio al 4% con rojo de fenol.
- Agitar en VORTEX cada tubo por 20 segundos.
- Incubar por 15 minutos a 37°C en baño maría con agitador o en estufa.
- Retirar los tubos del baño maría o estufa.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 20 minutos.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante en un recipiente a prueba de salpicaduras que contenga fenol al 5 % .
- Ajustar el pH neutralizando el sedimento con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 8 %.
- Observar viraje de rojo grosella a amarillo transparente.
- Inocular a dos tubos con medio Lowenstein Jensen 0.2 a 0.3 mL por tubo dejando escurrir sobre la superficie del medio.
- Colocar los tubos en bandeja de plano inclinado con tapas ligeramente flojas.
- Incubar en estufa a 37 °C.
- Revisar los tubos a 48 y 72 horas, ajustar las tapas, además verificar si algún tubo está alcalinizado (color blanco amarillento) o acidificado (color azul oscuro) o contaminado.
- El desarrollo de colonias antes de las 48 horas es indicativo de contaminación, algunas veces el medio se licúa por acción de gérmenes proteolíticos.
- Deben realizarse revisiones posteriores a los 7, 15, 30 y 60 días.

Lectura de resultados

Las colonias de *M. tuberculosis* se visualizan generalmente de 2 a 3 semanas de incubación; las colonias típicas son de color crema, rugosa con aspecto de coliflor, se desarrollan en la superficie del medio y no cambian de color. (Figura 10)

En caso de no observarse colonias a los 4 semanas deberá dejarse los cultivos en estufa hasta 8 semanas antes de emitir resultado como negativo.

La lectura se realizará de acuerdo a la siguiente escala:

- (-) No se observan colonias.
- Nº Número total de colonias, si hay menos de 20 colonias.
- (+) 20 a 100 colonias.
- (++) Colonias separadas más de 100.
- (+++)
(C) Colonias confluentes (desarrollo en toda la superficie del medio).
Contaminado.

Se debe realizar frotis de las colonias que no tienen morfología típica.



Fuente : Public health Mycobacteriology – CDC USA.

Figura 10. Crecimiento de colonias de micobacterias tuberculosas.

AISLAMIENTO Y SENSIBILIDAD POR BACTEC 460 TB

En 1969 Deland y Wagner, desarrollaron una técnica para la detección automática de metabolismo de la bacteria midiendo el $^{14}\text{CO}_2$ liberado durante la descarboxilación de sustratos marcado con ^{14}C presente en el medio. Middlebrook, introdujo medio líquido 7H12 conteniendo ^{14}C marcado como sustancia específica para crecimiento micobacteriano.

El sistema utiliza como principio biológico la detección radiométrica del CO_2 producido por la actividad metabólica de las micobacterias a partir de medios de cultivo específicos marcados con ^{14}C . La radioactividad de $^{14}\text{CO}_2$ es cuantificada en números en una escala de 0 a 999, lo que se considera como índices de crecimiento (GI).

Bactec 460 se utiliza para:

- Aislamiento (diagnóstico).
- Identificación.
- Prueba de sensibilidad a las drogas antituberculosas (S = SM, I = INH, R = RFP, E = EMB, y Z = PZA).

Para la detección de las Micobacterias se requiere de un equipo lector semiautomatizado utilizado para medir la presencia de dióxido de carbono radioactivo ($^{14}\text{CO}_2$) en el interior de los frascos de medio de cultivo. Este equipo tiene una capacidad para 60 frascos, y los índices de crecimiento (GI) se visualiza en la pantalla, al mismo tiempo que imprime e indica el N° de soporte y frasco (Figura 11).



Fuente: BECTON DICKINSON.

Figura 11. Equipo BACTEC 460 TB.

Medios utilizados en el Sistema BACTEC 460 TB

Performance test kit (PTK): Cada vez que se va utilizar el equipo BACTEC 460 TB, se utiliza el PTK, para control del funcionamiento y calibración del equipo. Los valores del GI aceptable deben estar entre 45 - 65.

Reactivos:

- 1 frasco de solución de bicarbonato marcado con ^{14}C .
- 1 frasco de ácido diluido.

MEDIO 12B (Middlebrook 7H12): Medio líquido utilizado para aislamiento de micobacterias a partir de muestras, clínicas (esputo, orina, aspirado gástrico, biopsias, etc).

Suplemento PANTA PLUS: Mezcla liofilizada de 5 antimicrobianos: polimixina B, anfotericina, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina. Este suplemento al agregarse al medio 12B inhibe el crecimiento de gérmenes contaminantes.

Fluido de reconstitución PANTA: Contiene esterato de polioxietileno (POES) sustancia que favorece el crecimiento.

NAP KIT (p-nitro-a-acetyl-amino-b-hidroxypropiofenona): Inhibe casi por completo las micobacterias del complejo TB, mientras que las otras micobacterias muestran una leve o ninguna inhibición. Esta prueba sirve para diferenciar *M. tuberculosis* de otras micobacterias (MOTT), al incrementar los GI de micobacterias MOTT y disminuir los GI del complejo TB.

Bactec S.I.R.E Drug kit: Drogas antituberculosas liofilizadas (estreptomina (S), isoniacida (I), rifampicina(R) y etambutol (E), utilizados para la prueba de susceptibilidad.

La prueba de sensibilidad se basa en el mismo principio básico utilizado en el método convencional, con excepción de que se utiliza medio líquido en lugar del medio sólido, el crecimiento se controla radiométricamente y los resultados se obtienen entre 4 a 12 días.

Tabla 6. Concentraciones críticas de medicamentos

Droga	BACTEC 12B (mg/ml)	Solución stock (mg/ml)
Estreptomina	2,0	240,0
Isoniacida	0,1	4,0
Rifampicina	2,0	80,0
Ethambutol	2,5	300,0

Fluido Diluyente (DF): Es parte de la prueba de BACTEC 460 de sensibilidad antibiótica para *M. tuberculosis*. Este líquido ayuda a la dispersión de micobacterias para generar una suspensión uniforme y homogénea.

La proporción crítica para determinar resistencia se considera 1%.

Para determinar el 1% de la proporción de resistencia en medio 12B el inóculo para el tubo control se diluye 1:100.

Medio PIRAZINAMIDA (caldo Middlebrook 7H12, pH 6.0): se utiliza para analizar susceptibilidad de *M. tuberculosis* a pirazinamida(PZA).

PZA Drug Kit.- liofilizada 20 mg /frasco: Fluido Reconstituyente, solución estéril de estearato de polioxietileno (POES).

Medio BACTEC 13A(Middlebrook 7H12): Sirve para recuperar micobacterias de la sangre. El objetivo de la prueba es para detectar micobacterias en pacientes con inmunodeficiencia (SIDA).

Aislamiento primario por BACTEC 460 TB

Procedimiento:

- En tubo de 50 mL dispensar la muestra y agregar igual cantidad de NaOH-N-acetyl-L-cysteina para la digestión y descontaminación, dejar por 15-20 minutos a medio ambiente.
- Adicionar buffer fosfato (pH 6,8) hasta completar 50 mL y mezclar.
- Centrifugar a 3000 rpm por 15-20 minutos.
- Descarta el sobrenante.
- Resuspender el sedimento con 1-2 mL de buffer fosfato y mezclar.
- Inocular 0.5 mL por vial.
- Inocular a 37°C.

Interpretación:

- Los viales deben leerse de 2 a 3 veces por semana durante 3 semanas y luego una vez por semana hasta completar 6 semanas.
- Un GI ³ 10 es probable positivo.
- Un GI = 50 A 100, hacer frotis y teñir por Z-N.
- Si se observa presencia de BAAR, se informa cultivo positivo.

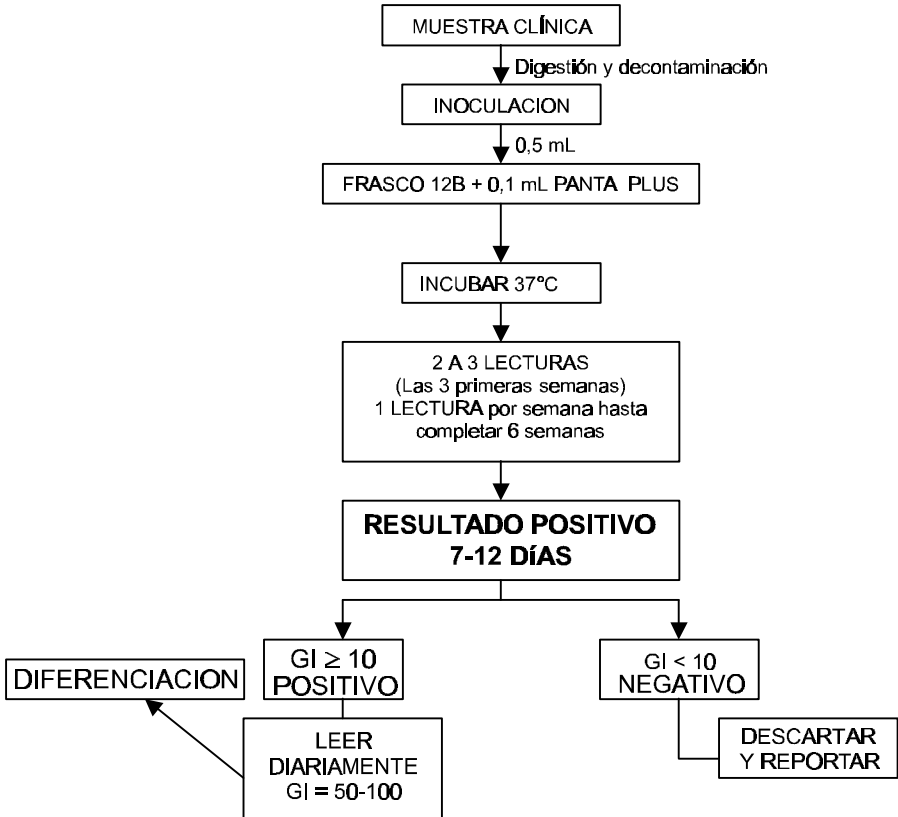


Figura 12. Algoritmo para los procedimientos de diferenciación utilizando BACTEC.

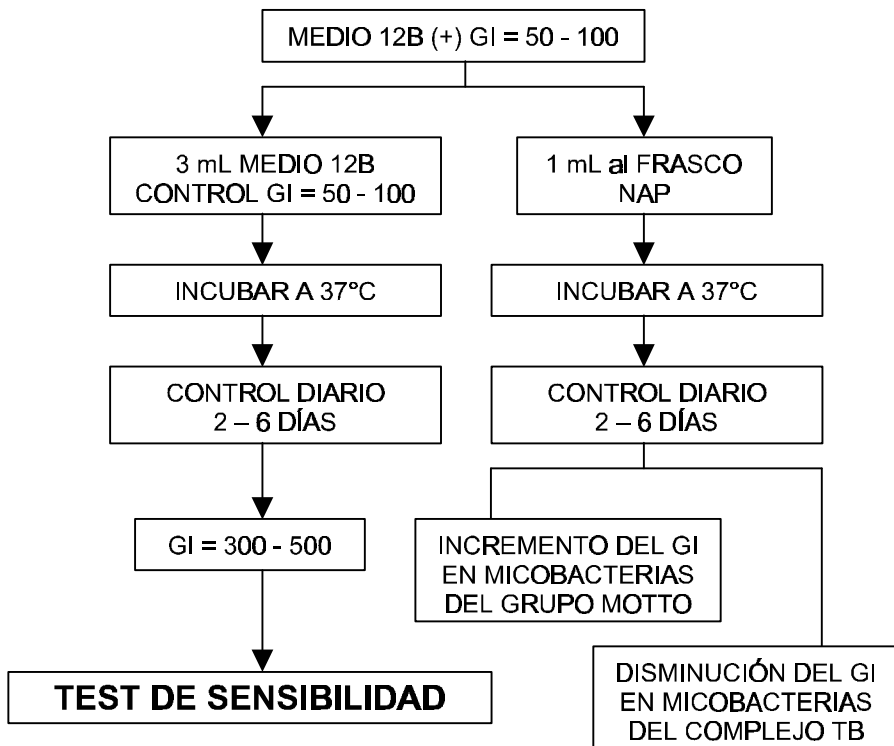


Figura 13. Algoritmo para los procedimientos para evaluar la sensibilidad, utilizando el sistema BACTEC.

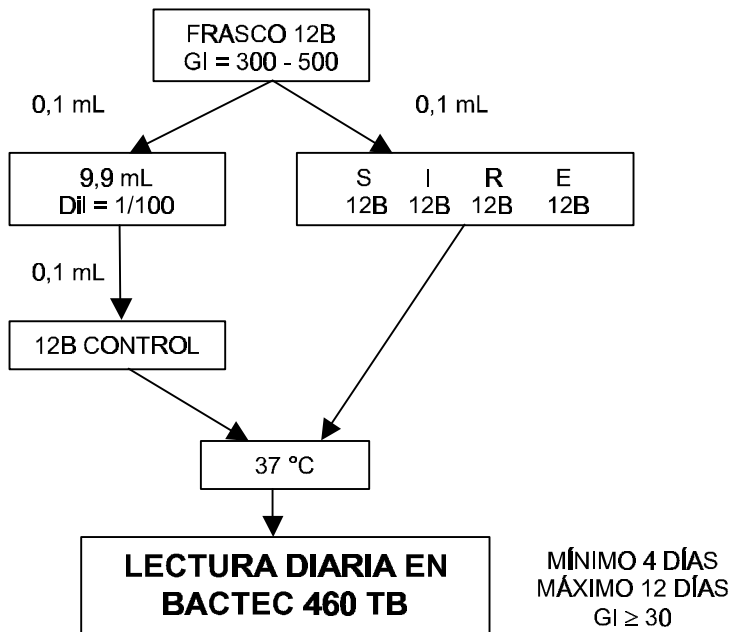


Figura 14. Interpretación de los resultados del Test de sensibilidad (S.I.R.E).

Tabla 7. Evaluación de resultados de Test de Sensibilidad.

Días	Lectura 1ra.	Lectura 2da.	Lectura 3ra.	Lectura 4ta.	GI	Resultado
C	1	18	19	49	30	-
S	3	29	8	3	0	S
I	2	544	824	829	>30	R
R	2	278	604	814	>190	R
E	4	65	14	11	-3	S

Interpretación de resultados de S.I.R.E

Cuando el GI del control alcanza un valor ≥ 30 interpretar los resultados: Calcular GI para frascos con drogas y el control, e interpretar como se indica:

- GI (control) > GI (droga): SENSIBLE
- GI (control) < GI (droga): RESISTENTE
- GI (control) = GI (droga): BORDERLINE

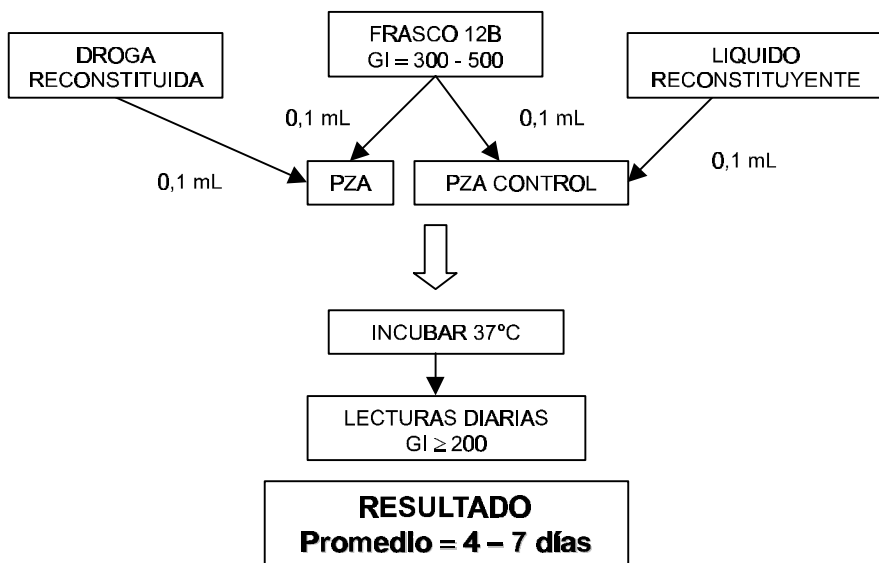


Figura 15. Test de Sensibilidad PZA.

Interpretación de resultados de PZA

GI representa la actividad metabólica del organismo en el medio. Cuando el GI del control alcanza un valor ≥ 200 interpretar los resultados:

$$\frac{\text{GI droga}}{\text{GI control}} \times 100$$

SENSIBLE : GI < 9%

RESISTENTE: GI > 11 %

BORDERLINE: GI entre 9% - 11%

Tabla 8. Evaluación de Test de PZA.

Días	Lectura 1ra.	Lectura 2da.	Lectura 3ra.	Lectura 4ta.	Lectura 5ta.
Control	9	31	74	195	475
PZA	6	9	9	4	4

$$\frac{\text{GI Droga}}{\text{GI Control}} = \frac{4}{475} \times 100 = 0,8\% = \text{SENSIBLE.}$$

Días	Lectura 1ra.	Lectura 2da.	Lectura 3ra.	Lectura 4ta.	Lectura 5ta.
Control	7	28	70	177	282
PZA	17	29	92	157	244

$$\frac{\text{GI Droga}}{\text{GI Control}} = \frac{244}{282} \times 100 = 86,5\% = \text{RESISTENTE.}$$

TIPIFICACIÓN DE MICOBACTERIAS

Además del *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la TB, descrito por R. Koch en 1882, existen otras especies micobacterianas patógenas para el hombre que alcanzan más de 40 y que han recibido la denominación conjunta de micobacterias “atípicas” o micobacterias no tuberculosas (MNT).

En 1959 E. Runyon propuso una clasificación de las micobacterias aisladas basadas en el tiempo de crecimiento y la pigmentación de las colonias.

CLASIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS ATIPICAS (SEGÚN RUNYON)

Grupo de crecimiento lento

Descripción

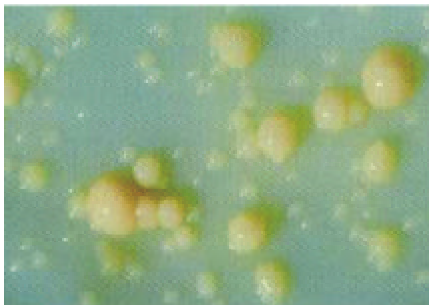
- | | |
|-----------------------------|--|
| I. Fotocromógenas | Crecimiento lento, colonias no pigmentadas en la oscuridad; los cultivos jóvenes adquieren color amarillo al exponerlos a la luz. <i>M. kansasii</i> |
| II. Escotocromógenas | Crecimiento lento, colonias pigmentadas amarillentas o anaranjadas en la oscuridad. <i>M. gordonae</i>, <i>M. scrofulaceum</i>, <i>M. flavescens</i>, <i>M. szulgai</i>. |
| III. No cromógenas | Crecimiento lento, colonias generalmente no cromógenas o débilmente pigmentadas. <i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i>, <i>M. gastri</i>, <i>M. terrae</i>, <i>M. triviale</i>. |

Grupo de crecimiento rápido

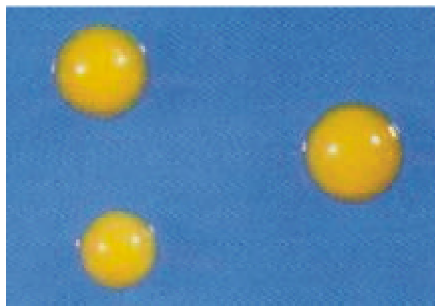
- | | |
|-----------------------------|---|
| I. Fotocromógenas | Crecimiento rápido, colonias no pigmentadas en la oscuridad; los cultivos jóvenes adquieren color amarillo al exponerlos a la luz. <i>M. marinum</i> |
| II. Escotocromógenas | Crecimiento rápido, colonias pigmentadas amarillentas-anaranjadas o irregular. <i>M. phlei</i>, <i>M. vaccae</i>, <i>M. smegmatis</i>. |
| III. No cromógenas | <i>M. fortuitum</i>, <i>M. chelonae</i>. |



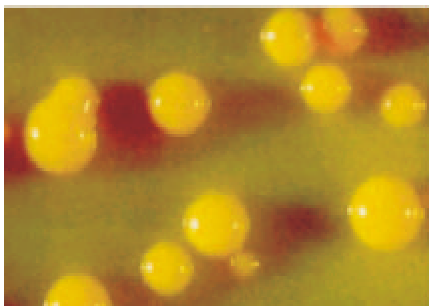
M. fortuitum



M. avium



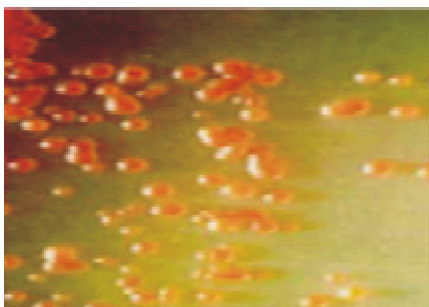
M. scrofulaceum



M. kansasii



M. tuberculosis



M. phlei

Fuente : Public health Mycobacteriology – CDC USA.

Figura 16. Micobacterias No tuberculosas.

Las micobacterias “atípicas”, si bien pueden causar infección en el hombre, en su mayoría han sido aisladas del medio ambiente. Por esta razón, se debe tener especial cuidado en asignar el papel de agente etiológico. La probabilidad de sospecha de infección por estas micobacterias aumenta cuando:

- Se obtienen varios cultivos de la misma cepa y de un mismo sujeto, en ausencia de *M. tuberculosis*.
- Los cultivos obtenidos presentan un desarrollo abundante.
- Existe enfermedad comprobada.
- Se observa mala respuesta al tratamiento antituberculoso.
- Se obtiene cultivo puro a partir de una lesión cerrada, de la cual se obtuvo la muestra por manipulación estéril.

Es importante que el Laboratorio Regional envíe al Laboratorio Nacional de Referencia el primocultivo y no el subcultivo de la cepa, a fin de que el Laboratorio Nacional conozca el número de colonias del cultivo y no exista previamente una selección de colonias.

METODOLOGÍA BÁSICA PARA LA DIFERENCIACIÓN DE MICOBACTERIAS

ASPECTO MICROSCÓPICO

Colocar una gota de agua sobre el portaobjetos, picar la colonia con el asa de siembra previamente flameada en la llama del mechero y enfriada, mezclar el material bacteriano con la gota de agua sobre la lámina. Efectuar la coloración Ziehl Neelsen a partir de colonias aisladas para comprobar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Se debe observar y anotar lo siguiente :

- Presencia de BAAR.
- Morfología.
- Tamaño.
- Presencia o ausencia de ramificación.

DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO

Para la determinación de la característica del cultivo se debe sembrar en el medio de cultivo diluciones que permitan determinar el tiempo de desarrollo y las características de las colonias formadas, presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR). Se debe observar y anotar lo siguiente:

- Preparar una suspensión bacilar y ajustar la turbidez con Mac Farland 1.
- A partir de la suspensión hacer una dilución 10^{-2} .
- Sembrar 0,2 mL de la dilución a 5 tubos con medio de cultivo de Lownstein Jensen e incubar en las condiciones siguientes:
 - Un tubo a 20 – 25°C (T° ambiente).
 - Un tubo a 32 – 33 °C (Cultivos procedentes de lesiones dérmicas).
 - Un tubo a 42 °C.
- Dos tubos a 37°C (Uno de estos cubierto con papel aluminio).
- Controlar y tomar nota de la aparición de colonias en cada uno de estos tubos a los 4, 7, 15 y 30 días. Anotar el aspecto de las colonias (lisas, rugosas, cremosas, brillantes, etc.), la presencia o no de pigmento, la temperatura a las cuales hubo desarrollo. Separar los tubos para realizar las pruebas enzimáticas de fotocromogenicidad).

PRUEBA DE LA NIACINA

La niacina juega un rol vital en las reacciones de oxidación-reducción que ocurre durante la síntesis metabólica en todas las micobacterias. Todas la micobacterias producen ácido nicotínico (Niacina).

Estudios comparativos han demostrado que a causa del bloqueo de la vía metabólica, *M. tuberculosis* acumula grandes cantidades, y la detección de esta niacina acumulada es útil para el diagnóstico definitivo de esta especie.

La prueba de niacina no sería usada sólo para identificar *M. tuberculosis* porque otras especies (Ej.: *M. simiae*, *M. chelonae*) y algunas cepas de BCG dan resultados consistentemente positivos.

Reactivos:

- Bromuro de cianógeno, solución acuosa al 4 – 10%.
- Cianuro de potasio al 20%.
- Solución alcohólica de bencidina o anilina al 4%.

Preparación de solución acuosa de bromuro de cianógeno:

En un cubículo con extractor de gases tóxicos o en un lugar abierto y ventilado, tomar con una pipeta 2 mL. de bromo que se encuentra en la capa inferior del frasco de

agua de bromo, depositar en el fondo del balón de 250 mL. previamente refrigerado. Agregar gota a gota la solución de cianuro de potasio al 20% hasta lograr una coloración ligeramente ámbar mezclando por rotación. Luego utilizar una solución de cianuro de potasio al 4% gota a gota hasta obtener una decoloración total (transparente).

- Cianuro de potasio al 20% (preparar al momento de utilizar).

Pesar 20 gramos de cianuro de potasio disolver en 100 mL. de agua destilada estéril, a partir de esta solución preparar la solución al 4%.

- Solución alcohólica de bencidina al 4%

Pesar 4 gramos de bencidina y disolver en 100 mL. de etanol al 95°. Guardar en frasco ámbar y en refrigeración.

- Solución alcohólica de anilina al 4%

Agregar 4 mL. de anilina incolora a 96 mL. de etanol al 95° y mezclar. Guardar en frasco ámbar y en refrigeración.

En ambos casos trabajar con guantes quirúrgicos por que los reactivos son tóxicos (cancerígenos) al penetrar por la piel.

Técnica:

- A un cultivo abundante de 4 semanas en medio Lowenstein–Jensen, agregar 2 mL. de agua destilada estéril caliente, dejar el tubo inclinado por lo menos 15 minutos. Luego colocar el tubo en posición vertical. Extraer 1 mL de sobrenadante y trasvazar a un tubo estéril de 13 x100 mm. tapa rosca.
- Agregar 0,5 mL. de bromuro de cianógeno.
- Agregar 0,5 mL. de solución anilina o bencidina al tubo.

Lectura:

Reacción positiva : coloración violeta, si se empleó bencidina.

coloración amarilla, si se empleó anilina.

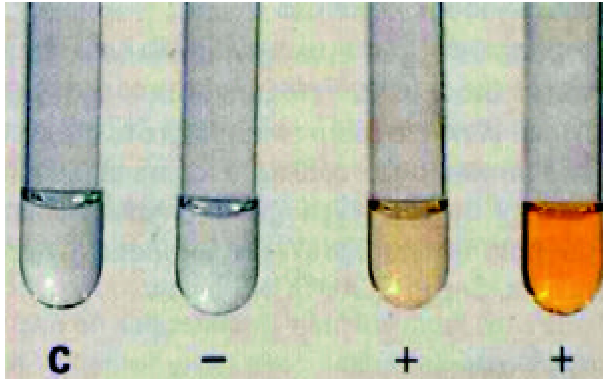
En ambos casos significa presencia de niacina.

Control (+): ***M. tuberculosis.***

Control (-): ***M. fortuitum*** y otras micobacterias.

ADVERTENCIA:

Todo procedimiento debe realizarse con suma precaución. Al finalizar las pruebas se debe agregar solución de NaOH al 4 % a los tubos, ya que el bromuro de cianógeno en presencia de ácido se convierte en ácido cianhídrico, que es muy tóxico.



*Fuente : Public health Mycobacteriology – CDC USA
Figura 17. Prueba de la Niacina.*

PRUEBA DE NITRATO REDUCCION

La habilidad para reducir el Nitrato ha demostrado ser valioso en la identificación diferencial de algunas micobacterias que poseen características similares como morfología de la colonia, pigmentación y grado de desarrollo.

Para la prueba de nitrato reducción los cultivos deben tener 4 semanas después de la inoculación del medio.

Reactivos:

- Solución acuosa de nitrato de sodio (NaNO_3) 0,01 M (0,085%).
- Reactivo de Lampe :
 - i. Acido sulfanílico, una parte.
 - ii. N-(1 naftil)etilendiamina, diclorhidrato, una parte.
 - iii. Acido L(+) tartárico, diez partes.

Mezclar mediante agitación enérgica los 3 reactivos químicos en las proporciones indicadas, guardar en frasco ámbar. La mezcla, debe ser agitada siempre antes de usarla, tiene una vida media no mayor de 6 meses.

Técnica :

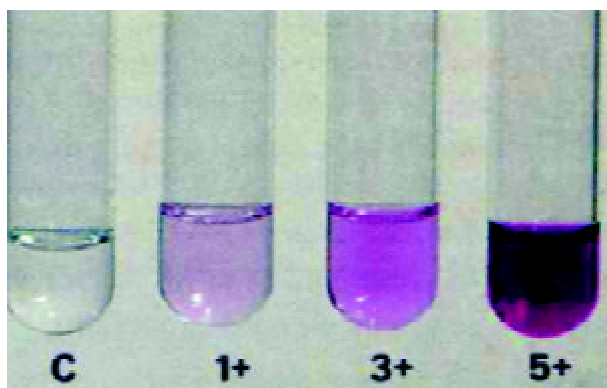
Utilizar tubos estériles de tapa rosca 13 x 100 mm, distribuir 2 mL de solución acuosa de nitrato de sodio, extraer colonias de un cultivo joven de 3 semanas (10 mg de masa bacilar) y colocar a los tubos, homogenizar. Dejar incubar a 37 °C durante 2 horas, agregar con una espátula estéril el reactivo de Lampe. Mezclar suavemente y leer.

Lectura e interpretación:

Prueba positiva : Si se desarrolla un color rojo grosella (puede variar de un rosado a rojo intenso).

Control positivo : Cultivo joven de *M.tuberculosis*.

Control negativo: Un tubo que contenga sólo solución acuosa de nitrato de sodio.



Fuente : *Public health Mycobacteriology – CDC USA*

Figura 18. Prueba de Nitrato reducción.

PRUEBA DE CATALASA A TEMPERATURA AMBIENTE Y A 68°C

Catalasa es una enzima intracelular soluble capaz de romper el H₂O₂ en agua. Las burbujas de oxígeno en la reacción indican la actividad de la catalasa. Todas las Micobacterias producen la enzima catalasa excepto ciertos mutantes de *M. tuberculosis* y *M. bovis* resistentes a Isonicida. La actividad de la catalasa varía con el calor.

Reactivos:

- Solución buffer de fosfato 15/M, pH 7.

Se prepara mezclando dos soluciones:

- a) Fosfato disódico M/15. Disolver en un matraz volumétrico 9.47 gramos de Na_2HPO_4 anhidro en agua destilada y aforar a 1000 mL.
- b) Fosfato monopotásico M/15. Disolver en un matraz volumétrico 9.07 gramos de KH_2PO_4 en agua destilada y aforar a 1000 mL.

Mezclar 61,1 mL. de la solución a) con 38,9 mL. de la solución b). Ajustar el pH.

- Agua oxigenada 100 volúmenes (peróxido de hidrógeno al 30%). Debe conservarse en frasco ámbar en refrigeración.
- Solución acuosa de tween 80 al 10 %. Calentar ligeramente el agua para obtener mejor disolución. Conservar en refrigeración.

Técnica:

Distribuir en tubos de aproximadamente 13 x 100 mm, 0,5 ml. de solución buffer pH 7 por tubo. Emplear dos tubos para cada cepa. Agregar a cada uno de ellos el contenido de un asa cargada de colonias, (10 mg). Dejar uno a temperatura ambiente y colocar el otro tubo en baño maría a 68°C durante 20 minutos. Retirar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Preparar una mezcla en partes iguales de la solución de Tween y el agua oxigenada y agregar 0,5 ml. de este reactivo a cada tubo. Esta mezcla debe ser preparada en el momento de ser usada.

Lectura e interpretación:

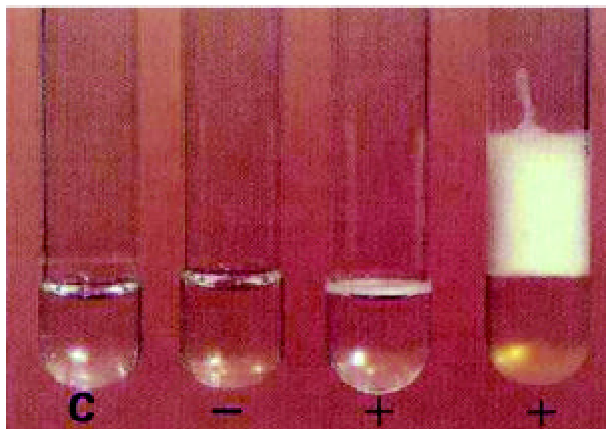
La formación de burbujas en la superficie se considera como resultado positivo. Si no se producen burbujas, dejar en observación 20 minutos antes de informar un resultado como negativo.

Los controles se hacen por duplicado: Una serie de tubos, a temperatura ambiente, y la otra, a 68°C.

Control negativo: Se utilizan dos tubos con 0,5 ml. de solución buffer pH 7.

Control positivo: Se emplea *M. tuberculosis* (catalasa positiva a temperatura ambiente y negativa a 68°C).

M. fortuitum o *M. phlei* (catalasa positiva tanto a temperatura ambiente como a 68°C).



Fuente : *Public health Mycobacteriology – CDC USA*

Figura 19. Prueba de Catalasa.

PRUEBA DE HIDROLISIS DE TWEEN

Reactivos:

- Tween 80.
- Rojo Neutro.
- Solución reguladora de fosfato M/15, pH 7.

Disolver 0.5 mL de Tween 80 y 2,0 mg de rojo neutro en 100 mL de solución reguladora, controlar el pH, que no debe ser menos de 7,0 y el color amarillo ambar.

Distribuir en tubos de 16 x 125 mm, con tapa rosca (4 mL c/u). Autoclavar 15 minutos a 121 °C. Conservar en refrigeración y sin contacto con la luz, no más de dos semanas.

Técnica:

Suspender en el sustrato colonias de un cultivo joven en medio sólido. Incubar a 37°C sin contacto con la luz y examinar a los 5 y a los 10 días. Incubar un tubo control sin inóculo.

Lectura e interpretación:

Observar los tubos, comparativamente con el control ambar. Se considera Positivo un cambio de color a rosa salmón.

Tomar nota de la fecha en que se observa ese cambio y seguir incubando hasta completar los 10 días para confirmar, el color puede intensificarse a rosado más intenso y hasta rojo oscuro.

Se informan los resultados tanto como POSITIVOS o NEGATIVOS a los 5 y a los 10 días.

Los tubos no deben ser agitados antes de la lectura. Algunas células pueden tomar el colorante, lo que provoca un color rosado en el sedimento del tubo, mientras que el sobrenadante continúa amarillo; en estos casos el informe es negativo.

TOMA DE HIERRO

Reactivo:

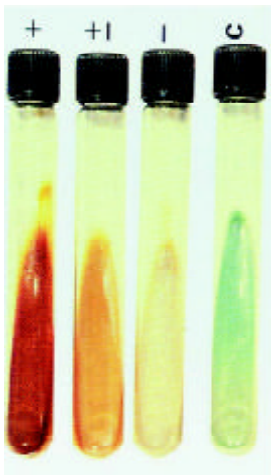
- Solución acuosa de citrato de hierro amoniacal al 4%. Esterilizar en autoclave.

Técnica:

Inocular 2 tubos de medio Lowenstein Jensen, cada uno con 0,1 mL de una suspensión bacilar de aproximadamente 1 mg/mL, de la cepa problema. Colocar los tubos inclinados, difundiendo la siembra en toda la superficie del medio. luego colocarlos verticalmente y añadir en el fondo de uno de ellos 1 mL de la solución de citrato de hierro amoniacal. En el otro, agregar 1 mL de agua destilada estéril.

Lectura e Interpretación

De ser la reacción POSITIVA aparece en el tubo con citrato, entre la primera y la tercera semana de incubación, un color marrón que se va extendiendo a las colonias por encima del nivel del líquido. Se compara con el tubo control.



*Fuente : Public health Mycobacteriology – CDC USA
Figura 20. Toma de Hierro.*

PRUEBA DE TOLERANCIA DE CLORURO DE SODIO

Reactivos:

Antes de su coagulación del medio Lowenstein Jensen, agregar la solución de cloruro de sodio a la concentración del 5%.

Técnica:

Inocular una suspensión bacilar, de concentración aproximada de 1 mg/mL, en agua destilada a 2 tubos de Lowenstein Jensen, uno con ClNa y otro sin agregado. Incubar a 37°C y examinar una vez por semana, durante 4 semanas.

Lectura e Interpretación

En el tubo control normalmente se obtendrá desarrollo de colonias incontables. Si, en esas condiciones, en el tubo con ClNa se observa desarrollo de más de 50 colonias, se considerará que la cepa es resistente o tolerante al ClNa; y si el desarrollo es menor de 50 colonias, se considerará que es SENSIBLE.

PRUEBA DE ARILSULFATASA

Arilsulfatasa es una enzima capaz de hidrolizar las cadenas entre el grupo sulfato y la estructura del anillo aromático $R-OOSO_3H$, cuando el sustrato Fenoftaleína disulfato de potasio es incorporado en el medio con crecimiento. La Fenoftaleína es liberado por hidrólisis enzimático, lo cual se evidencia por el color rojo que desarrolla cuando se adiciona el álcali.

Reactivo:

- Solución de carbonato de sodio 2,0 N (disolver 10,6 g de CO_3Na_2 anhidro en 100 mL de agua destilada).
- Solución 0,08 M de fenofteleína disulfato tripotásico (2,6 g del reactivo en 50 mL de agua destilada). Esterilizar por filtración, mantener en refrigeración.

Técnica:

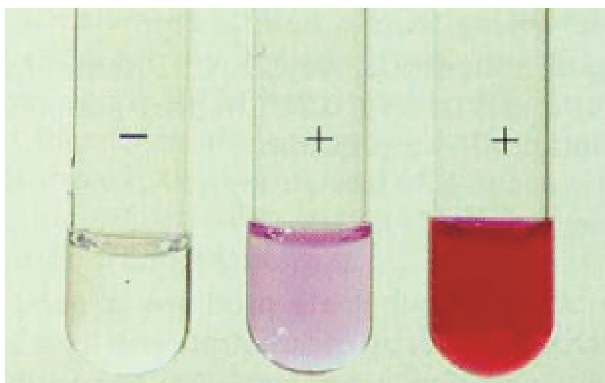
Prepara 200 mL de medio Líquido de Dubos. Agregar al medio de 2,5 mL de la solución de fenofteleína disulfato tripotásico para la prueba de 3 días y 7,5 mL para la prueba de dos semanas. Distribuir asépticamente en tubos de 16 x 125 mm con tapa de rosca, 2,0 en cada tubo.

Para cada cepa, inocular 0,1 de una suspensión bacilar concentrada o colonias tomadas de un cultivo joven. Incubar a 37°C. a los 3 días, agregar en el tubo correspondiente 6 gotas de la solución de CO_3Na_2 . A las 2 semanas hacer lo propio en el tubo restante.

Lectura e Interpretación

Emplear como control negativo un tubo con sustrato sin inóculo y como control POSITIVO un tubo inoculado con *M. fortuitum*.

La aparición de color rojo o rosado indicada resultado positivo.



Fuente : *Public health Mycobacteriology – CDC USA*

Figura 21. Prueba de Arilsulfatasa.

PRUEBA DE UREASA

Medio:

Peptona	1 g
Dextrosa	1 g
Cloruro de sodio (ClNa)	5 g
Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$)	2 g
Urea	20 g
Rojo fenol	0,012 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

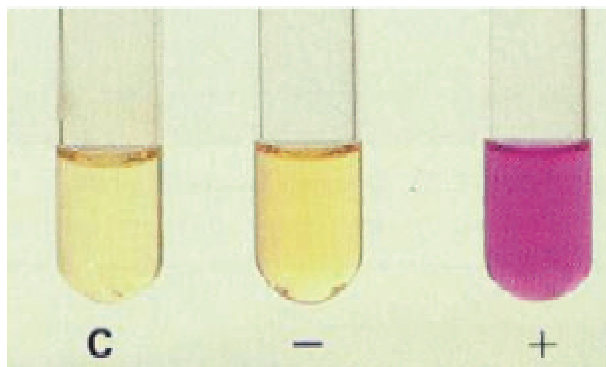
Esterilizar por filtración: Diluir 1/10 con agua destilada y distribuir a tubos estériles 13 x 100 mm con tapa rosca.

Técnica:

Agregar al tubo con el asa colonias de un cultivo joven.
Incubar 3 días a 37° C

Lectura:

La aparición de color rosa se interpreta como resultado POSITIVO. La comparación se efectua con un tubo control no inoculado.



Fuente : *Public health Mycobacteriology – CDC USA*
Figura 22. Prueba de Ureasa.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSAS

M. tuberculosis adquiere resistencia a los medicamentos antituberculosos mediante mutaciones que se producen en el cromosoma bacteriano. Hasta el momento no existe evidencias de que ocurra otro tipo de mecanismo en *M. tuberculosis*.

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

El método de las proporciones de **CANETTI, RIST Y GROSSET** es el que se utiliza para establecer la sensibilidad o la resistencia de una cepa de *M. tuberculosis* a las distintas drogas antituberculosas. Este método consiste en medir la proporción de bacterias resistentes que existen en cada cepa.

UTILIDAD DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Clínica individual:

- Cuando el paciente ha abandonado, en más de 2 veces, el tratamiento.
- Cuando el paciente tiene más de dos episodios de tratamiento.
- Cuando el paciente no negativiza (fracaso) luego de 6to mes de tratamiento.
- En todo paciente VIH/SIDA.

Estudios epidemiológicos:

Para determinar la resistencia primaria (RP) y la resistencia adquirida (RA).

- Resistencia Primaria (RP): Es aquella que se observa en pacientes que nunca recibieron tratamiento antituberculoso.
- Resistencia Adquirida (RA): Es aquella que aparece en el curso del tratamiento, usualmente como resultado de un régimen terapéutico inadecuado, fallas en la prescripción, falta de cumplimiento del tratamiento de parte del paciente.

A fin de realizar una vigilancia epidemiológica de la evolución de la resistencia a drogas y evaluar los esquemas de tratamiento en el Programa de Control de la Tuberculosis.

Los criterios de resistencia son:

Concentración Crítica: Es la concentración capaz de inhibir el desarrollo de todas o casi todas las cepas salvajes (cepas aisladas de pacientes nunca tratados).

Proporción Crítica: Es la proporción de mutantes resistentes de una población bacilar, por encima de la cual la cepa es considerada resistente.

Tabla 9. Criterios de Resistencia de M. tuberculosis.

Drogas	Concentración crítica (mcg/ml)	Proporción crítica (%)
Isoniacida (INH)	0.2	1
Estreptomina (SM)	4.0	1
Etambutol (EMB)	2.0	1
Rifampicina (RFP)	40.0	1

a = Número total de bacilos cultivables (colonias en el medio sin droga).

b = Número de bacilos resistentes de la población total (colonias desarrolladas en el medio con droga).

$\frac{b}{a} \times 100$ (Para determinar la resistencia de la cepa)

a

Se cuentan cuidadosamente las colonias desarrolladas en los tubos controles de la serie en que es posible hacerlo; la media de la suma de las colonias contadas en los dos tubos control indica el número de bacilos sembrados por tubo.

En la misma serie se cuentan las colonias desarrolladas en cada una de los tubos con droga. La relación entre el número de mutantes resistentes a determinada droga y el número de bacilos sembrados (tubos control) multiplicada por 100 da el porcentaje de resistencia a esa droga.

Comparando este porcentaje con la proporción crítica establecida para esa droga se determina si la cepa es sensible o resistente.

MATERIALES PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

- Patrón turbidimétrico, Escala de McFarland Nº 1.
- Cepa en estudio.
- Gradilla de metal.
- Propipeta.
- Pipeta de 10 mL.
- 14 pipetas de 1 mL graduadas en centésimos.
- Una espátula de acero quirúrgico estéril.
- Un matraz con agua destilada estéril.
- Seis tubos, cada uno con 9 mL de agua destilada estéril y rotulados: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

Procedimiento:

Todo el procedimiento debe realizarse en una Cabina de Bioseguridad Tipo II.

a) Preparación de la suspensión bacilar:

- Distribuir 3 mL de agua destilada estéril en tubos de prueba de 20 x 150 mm estéril, con tapón de algodón.
- Extraer las colonias de la cepa en estudio con una espátula, cogiendo el mayor número posible.
- Colocar las colonias en la pared interna del tubo, humedecer éstas con el agua
- Triturar las colonias con ayuda de una bagueta esmerilada estéril, hasta lograr homogenizarlas.
- Mezclar suavemente con la ayuda de la bagueta, hasta obtener una suspensión homogénea.
- Dejar reposar la suspensión por unos minutos hasta sedimentar.
- Tomar el sobrenadante y ajustar la turbidez de la suspensión (suspensión madre) comparando con el patrón de turbidez que contiene un miligramo/mL de masa bacilar.

b) *Preparación de Diluciones:*

- Distribuir 9 mL de agua destilada estéril a cada uno de los 6 tubos (20x150 mm)
- Previamente esterilizados y roturarlos del 1 al 6.
- Preparar diluciones al décimo de 10^{-1} a 10^{-6} .
- Con una pipeta aspirar 1 mL del sobrenadante de la suspensión madre agregar al tubo rotulado con 10^{-1} , cambiar de pipeta y mezclar bien para homogenizarlo.
- Tomar 1 mL de la dilución 10^{-1} y agregar al tubo rotulado con 10^{-2} , y homogenizar bien. Continuar con las diluciones así sucesivamente hasta llegar al tubo rotulado con 10^{-6} .
- Es importante cambiar de pipeta en cada dilución.
- Separar los tubos 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} .

c) *Siembra:*

- Antes de la siembra verificar si los medios contiene líquido de condensación, el cual debe eliminarse.

Serie 1. Dilución 10^{-3}

Se siembra 0,2 mL de la dilución a cada uno de los siguientes tubos:

- 2 tubos de medio Lowenstein-Jensen sin droga, es el tubo Control.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Isoniacida.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Estreptomicina.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Etambutol.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Rifampicina.

Serie 2. Dilución 10^{-5}

Se siembra 0,2 ml de la dilución a cada uno de los siguientes tubos:

- 2 tubos de medio Lowenstein-Jensen sin droga, es el tubo Control.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Isoniacida.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Estreptomicina.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Etambutol.
- 1 tubo con medio Lowenstein-Jensen con Rifampicina.

Serie 3. Dilución 10^{-6}

Se siembra 0,2 mL de la dilución a 2 tubos de medio Lowenstein-Jensen sin droga, tubo Control.

- Para la siembra de las diluciones (10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-6}) se utilizarán pipetas diferentes de 1 mL graduada al décimo.
- Una vez sembradas las tres series, se toma cada tubo por sus extremos manteniéndolo en posición horizontal y haciéndolo rotar suavemente para que la suspensión sembrada se distribuya sobre toda la superficie del medio.

- Los tubos se colocan en una bandeja de madera de fondo inclinado para mantenerlos en posición horizontal. La bandeja se lleva a estufa de 37° C, cuidando que los tubos no roten, pues si esto sucede las colonias se desarrollarán en el borde del medio y no podrán ser contadas.
- Los tubos que se utilizan para el medio de cultivo tienen tapa rosca, éstas deben mantenerse sueltas durante las primeras 48 horas o hasta que se evapore la parte líquida de la siembra, después de lo cual se ajustarán fuertemente.

d) *Lectura e Interpretación de Resultados:*

- Se realizan dos lecturas: 1ra. lectura a las 4 semanas y 2da. lectura a las 6 semanas.
- Se cuentan cuidadosamente las colonias desarrolladas en los 2 tubos control de cada serie, la media de la suma de las colonias contadas indica el número de bacilos sembrados por tubo.
- Luego se cuentan las colonias desarrolladas en los tubos con droga.

Como se sabe que la suspensión madre de la cepa en estudio contiene 1 mg/mL de masa bacilar. Sin embargo la cantidad de bacilos en 1 mg de masa bacilar varía considerablemente de una cepa a otra; esta variación puede ser de un millón a 100 millones de gérmenes. Por ello es necesario sembrar las dos diluciones 10^{-3} y 10^{-5} .

Ejemplo1:

Si la suspensión madre contiene 100 millones de gérmenes por mililitro la suspensión 10^{-3} , que ha sido diluida mil veces, contiene 100 mil gérmenes. Como la siembra se efectúa con la quinta parte de 1 mL (0,2 mL) en el tubo control desarrollarán aproximadamente 20 mil colonias que es imposible de contar. Como también se siembra la suspensión 10^{-5} que por haber sido diluida 100 mil veces más que la suspensión madre, contiene mil gérmenes por mL al sembrar la quinta parte de 1 mL (0,2 mL) desarrollarán en el tubo control 200 colonias, que pueden ser contadas y permitirán establecer el resultado de la prueba.

Ejemplo 2:

Si la suspensión madre contiene un millón de bacilos por mililitro, la siembra de 0,2 mL de la suspensión 10^{-5} , dará origen a sólo 2 colonias, cifra absolutamente insuficiente para determinar un porcentaje. Pero la siembra de 0,2 mL de la suspensión 10^{-3} , dará un desarrollo de 200 colonias cifra que permite realizar el cálculo.

En el primer ejemplo, la lectura de la prueba se pudo efectuar en la serie 10^{-5} , mientras que la serie 10^{-3} sólo sirvió como comparación. En el segundo ejemplo, la lectura de la prueba se pudo efectuar en la serie 10^{-3} .

A veces no es posible contar las colonias en los tubos de control de ninguna de las series 10^{-3} y 10^{-5} , en estos casos las colonias en el tubo 10^{-6} permitirá calcular el número de colonias.

En casos en que el número de colonias desarrolladas en los tubos de control de la serie 10^{-3} sea inferior a 200, se debe repetir la prueba.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA PIRAZINAMIDA

PIRAZINAMIDA (PZA)

Es una amida del ácido pirazinoico, droga activa a pH ácido es bactericida contra *Mycobacterium tuberculosis*.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LA PIRAZINAMIDA – MÉTODO DE WAYNE

Fundamento:

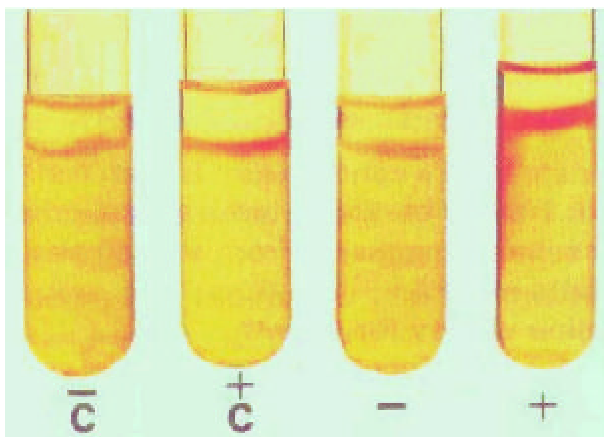
Las cepas de *M. tuberculosis* que son sensibles a la pirazinamida poseen la enzima pirazinamidasa, que metaboliza la pirazinamida en ácido pirazinoico. Las cepas pirazinamida resistente han perdido su actividad pirazinamidasa.

Procedimiento:

- Con un asa recoger de 5 a 10 mg de masa bacilar de un cultivo de 4 semanas e inocular sobre la superficie del medio Dubos.
- Incubar a 37°C x 4 días.
- Al cuarto día retirar los tubos de la estufa y agregar 1 ml solución sulfato ferroso amoniacal 1% y colocar los tubos a -4°C x 4 horas.

Lectura e interpretación:

- *Sensible*: Banda rosada de difusión de sal ferrosa indica hidrólisis de la pirazinamida con formación de ácido pirazinoico.
- *Resistente*: No se observa banda rosada.



Fuente : Public health Mycobacteriology – CDC USA
Figura 23. Prueba de sensibilidad a la Pirazinamida.

INDICACIONES PARA LA REALIZACION DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Cultivo positivo obtenido de muestras de pacientes:

- Al término del quinto mes de tratamiento.
- En retratamiento.
- Multitratados.
- HIV Positivos/SIDA.
- Para estudios epidemiológicos de Resistencia Primaria y Adquirida del *M. tuberculosis*, a los medicamentos antituberculosos.

RECOMENDACIONES

- Los cultivos deben estar acompañados de sus respectivas fichas.
- Anotar en el tubo el N° de identificación y la fecha de siembra.
- El cultivo no debe tener menos de 30 días ni más de 60 días contados a partir de la fecha de siembra.
- El número de colonias por tubo no deberá ser menor de 10 colonias claramente diferenciadas.
- El medio no deberá estar alcalinizado, acidificado ni contaminado con hongos.
- El tubo de cultivo no deberá contener líquido, ni el medio encontrarse licuado.
- Los tubos de cultivo deberán estar sellados con cinta adhesiva para asegurar el cierre hermético.
- Los tubos de cultivo deben enviarse en cajas de material resistente debidamente acondicionados para evitar la rotura de los tubos.
- Anotar la dirección exacta del laboratorio donde se realizará prueba.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la salud. Bacteriología de la Tuberculosis. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS); 1988. Nota Técnica N-28, Nro. 26.
2. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la salud. Bacteriología de la Tuberculosis. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS); 1988. Nota Técnica N-28, Nro. 27.
3. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la salud. Bacteriología de la Tuberculosis. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS); 1988. Nota Técnica N-28, Nro. 28.
4. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la salud. Bacteriología de la Tuberculosis. Buenos Aires: Centro Panamericano de Zoonosis (OPS/OMS); 1988. Nota Técnica N-28, Nro. 29.
5. Jawest E, Melnich J. Microbiología Médica. México; 1991.
6. UICTER. Boletín de la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias 1990; 65 (2-3).
7. Lazlo A, Kantor I. Encuesta por muestreo aleatorio de fármaco. Resistencia inicial en casos de tuberculosis en América Latina. Bol OPS 1995; 119(3).
8. Hirata T. Mycrocitology of Mycobacteria International Training Course. RITB. Japan; 1993.
9. Raheman SF, Wagner S, Mauch H, Vasudeva ND. Evaluation of a dual- Antigen ELISA test for the serodiagnosis of tuberculosis. Bull WHO 1988; 66(2): 203-9.
10. Wu CH, Fann MC, Lau YJ. Detection of Mycobacterial Antigens in Cerebrospinal Fluid by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Tubercle 1989; 70(1): 37-43.
11. Maekura R, Naragawa M, Nakamura Y. Clinical Evaluation of Rapid serodiagnosis of Pulmonary. Tuberculosis by ELISA with cord Factor of *M. tuberculosis*. Am Rev Resp Dis 1993; 148: 997-1001.
12. Canetti G, Rist N, Grosset J. Medida de la Sensibilidad del Bacilo Tuberculoso a las Drogas Antibacilares por el Método de las proporciones. París: Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas, Instituto Pasteur; 1969.
13. Kent P, Kubica G. Public Health Mycobacteriology a guide for the Level III Laboratory. Georgia: Centers for Disease Control Atlanta; 1985.
14. Ministerio de Salud. Tuberculosis en el Perú. Lima: Dirección General de Salud de las Personas / Programa Nacional de Control de Enfermedades Transmisibles / Control de la Tuberculosis; 2000. Informe 2000.
15. Waren R. DNA fingerprinting and molecular epidemiology of tuberculosis: use and interpretation in an epidemic setting. Electrophoresis 1999; 20: 1807-12.
16. Rattan A, Kalia A, Ahmad N Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular perspectives. Emerg Infect Dis 1998; 4(2):195-209.
17. Williams DI, Limbers C, Spring L, Jayachandra S, Gillis T. PCR/Heteroduplex detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. In: PCR protocol for emerging infectious diseases. Ed David Persing; 1994. p. 122-129.

18. Prosser J. Detecting single-base mutations. *TIBTECH* 1993; 11:238-246.
19. Suffys PN, De Araujo ME, Degraeve WM. The changing face of the epidemiology of tuberculosis due to molecular strain typing—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92(3):297-316.
20. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31(2): 406-9.
21. Alland D, Kalkut GE, Moss AR, Mc Adam RA, Hahn JA, Bosworth W, et al. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994; 330(24):1710-6.
22. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330(24): 1703-9.
23. Van Soolingen D, Qian L, De Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33(12): 3234-8.
24. Agerton TB, Valway SE, Blinkhorn RJ, Shilkret KL, Reves R, Schluter WW, et al. Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States. *Clin Infect Dis* 1999; 29(1): 85-92.
25. Kato-Maeda M, Small PM. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. *West J Med* 2000; 172(4): 256-9.
26. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; 6:444-9.
27. Baldeviano C, Vásquez L, Quispe N. Triplicación Molecular de *Mycobacterium tuberculosis* mediante análisis de RFLP-IS6110. En: Primer Congreso Internacional de Inmunología. Lima-Perú; 2001.
28. Calderon R, Asencios L, Leo E, Montoya Y. Detección Molecular de drogorresistencia en *Mycobacterium tuberculosis*. En: Primer Congreso Internacional de Inmunología. Lima-Perú; 2001.
29. Telenti A, Honore N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B, et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microb* 1997; 35(3): 719-23.
30. Bartfai Z, Somoskovi A, Kodmon C, Szabo N, Puskas E, Kosztolanyi L, et al. Molecular characterization of Rifampin-Resistant Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the Line Probe Assay. *J Clin Microbiol* 2001;39(10): 3736-9.

ANEXO 1

MATERIALES Y EQUIPOS PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS A BASE DE HUEVO

- Estufa 37°C.
- Balanza.
- Coagulador.
- Potenciómetro.
- Refrigerador.
- Erlenmeyer x 500 ml.
- Probeta x 100 mL.
- Pipetas capilares.
- Pipetas serológicas de 1 mL.
- Pipetas x 10 mL.
- Embudo.
- Beaker x 500 mL.
- Tubos de prueba 20 x 125 CTR.
- Bagueta estéril.
- Gasa estéril (cuatro capas de 20cm x 20 cm).
- Algodón.
- Bandejas de acero inoxidable.
- Estuche para pipetas de acero inoxidable.

ANEXO 2

MEDIOS A BASE DE HUEVO

Las micobacterias tienen especial preferencia por medios de cultivo ricos en lípidos los cuales son obtenidos de la yema del huevo.

Los medios a base de huevos están constituidos, en general, por soluciones reguladoras a base de fosfatos, ciertos cationes en muy bajas concentraciones, una fuente de carbono (glicerol), y nitrógeno (asparagina en el medio de Lowenstein-Jensen y ácido glutámico en medio de OGAWA). Además contiene verde de malaquita que actúa como inhibidor de la flora asociada, contraste del medio e indicador del pH.

COMPOSICION PARA LA PREPARACION DEL MEDIO OGAWA

Fosfato Monobásico de Potasio KH_2PO_4	3 g.
Glutamato de sodio	1 g.
Glicerol	6 mL.
Agua destilada	100 mL.
Huevo	200 mL.
Verde de Malaquita 2%	6 mL.

Preparación de sales

- Pesar el Fosfato Monobásico de potasio y el Glutamato de Sodio, disolver en agua destilada 100 mL
- Esterilizar en autoclave a 121° C por 15 minutos o hervir en baño María por 30 minutos.
- Agregar la glicerina.
- Dejar enfriar.

Nota: Los materiales de vidrio a utilizar deberán estar esterilizados.

Preparación de Verde de malaquita 2%.

Verde de Malaquita	2 g.
Agua destilada estéril	100 ml.

- Pesar el Verde de Malaquita y poner en un frasco color ámbar.
- Agregar el agua destilada y disolver completamente.
- Esterilizar a 121 °C x 10 minutos.
- Guardar a medio ambiente, utilizar dentro de la semana de su preparación.

Preparación del Medio OGAWA.

- Lavar los huevos con agua y jabón, dejarlos secar.
- Limpiar con algodón empapado en alcohol 70%, dejar secar, romper uno por uno los huevos en una placa petri.
- Observar si se encuentran frescos, vaciar en un beaker.
- Homogenizar con una bagueta la yema y clara del huevo.
- Filtrar en un beaker utilizando gasa estéril de 4 capas.
- Añadir 6 ml. de la solución acuosa de verde de malaquita al 2% a la solución de sales.
- Mezclar con movimientos suaves hasta homogenizar completamente.
- Agregar los huevos filtrados a la solución de sales.
- Mezclar bien y dejar reposar por 30 minutos, para que las burbujas que se hayan formado afloren a la superficie y desaparezcan.
- Medir el pH del medio 6,2 – 6,4.
- Distribuir 6,5 mL en tubos de 20 x 125 mm tapa rosca y 7,5 mL en tubos de 20 x 150 mm evitando la formación de burbujas
- Colocar los tubos con medio en el coagulador a 90 °C x 60 minutos con las tapas ligeramente flojas.
- Retirar los tubos y dejar enfriar a medio ambiente.
- Controlar los medios en estufa a 37 °C por 24 horas.
- Revisar los medios y ajustar las tapas.
- Conservar los medios en refrigeración, en una bolsa de plástico.
- Los medios pueden ser usados dentro del mes de su preparación.

Materiales y Equipos para el procesamiento del cultivo Método de Ogawa.

- Hidróxido de Sodio NaOH al 4 % estéril.
- Tubos con medio OGAWA.
- Tubos de 25 x 150 con tapa rosca.
- Pipeta de 10 mL.
- Pipeta Pasteur.
- Estufa a 37°C.
- Pro-pipeta.
- Bandeja de acero inoxidable.
- Solución acuosa de fenol 5%.
- Baño María con agitador.
- Cabina de flujo laminar.

Preparación de Solución Hidroxido de Sodio al 4 %.

- Hidróxido de Sodio 4 g.
- Agua destilada 100 ml.

Pesar 4 g. de Hidróxido de Sodio y disolver en 100 mL de agua, destilada, luego esterilizar en autoclave y guardar en frasco a 4° C, debidamente rotulado.

MEDIO LOWENSTEIN-JENSEN

Composición.

Fosfato monopotásico	2.4	g.
Sulfato de Magnesio	0.24	g
Citrato de Magnesio	0.6	g
L-Asparagina	3.6	g
Glicerina	12	mL
Agua destilada c.s.p.	600	mL
Huevo	1000	mL
Verde de Malaquita 2%	20	mL

Preparación de sales.

- Disolver las 3 primeras sales y la asparagina en 300 mL de agua destilada en un erlenmeyer de 2000 mL, calentar en baño María hasta la disolución de la asparagina, completar a 600 mL con agua destilada.
- Agregar 12 mL de glicerina.
- Esterilizar en Baño María x 30 minutos o autoclavar a 121 °C x 15 minutos.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Preparación del Medio.

Lavar los huevos con agua y jabón, dejar secar.

- Limpiar con algodón empapado en alcohol al 70%, dejar secar, romper uno por uno los huevos en una placa petri.
- Observar si se encuentran frescos, vaciar en un beaker de 2000 mL.
- Homogenizar con una bagueta la yema y clara del huevo.
- Filtrar en un beaker 1000 mL, utilizando gasa estéril de 4 capas.
- Agregar la solución acuosa de verde de malaquita al 2 % a la solución de sales.
- Agregar la suspensión de huevos homogenizados.
- Mezclar suavemente con movimientos circulares.
- Dejar reposar el medio preparado por 30 minutos para que desaparezcan las burbujas. Cubrir con una franela de color oscuro para proteger de la luz.

Dispensar:

Distribuir 6,5 mL de medio a tubos de 20x125 mm tapa rosca, 7,5 mL a tubos de 20 x150 mm y 5 mL. en tubos de 16x125 mm. Evitar la formación de burbujas dispensando el medio por las paredes del tubo.

Coagular:

- Colocar los tubos con medio en el coagulador a 85°C por 45 minutos con las tapas ligeramente flojas.
- Retirar los tubos y dejar enfriar a medio ambiente.

- Ajustar las tapas

Nota: El coagulador debe de haberse encendido previamente hasta lograr la temperatura de 85 °C.

Control de esterilidad:

- Colocar los medios en estufa a 37 °C por 24 horas
- Revisar los tubos para observar si existe contaminación.

Almacenamiento:

- Conservar los medios en refrigeración a – 4°C, en una bolsa de plástico
- Los medios pueden ser usados dentro del mes de su preparación

Preparación de solución Rojo de Fenol.

- Solución A) - 0.1 gr. Rojo de fenol
- 25 ml de agua destilada
- Solución B) - 50 ml hidróxido de sodio 4%
- 4 gotas Solución A)

En frascos pequeños se autoclava por 15 minutos, guardar en lugar fresco.

Diseño e impresión
NRC Corporación Gráfica S.A.C.

Calle 7 N° 369, Urb. Corpac, San Isidro
Telefax: 226-2028
E-mail: nrscac@qnet.com.pe

Lima - Perú
Noviembre, 2001

Tiraje: 1,500



Esta publicación fue realizada gracias al apoyo técnico-financiero del proyecto VIGIA "Enfrentando las Amenazas de las Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes" Convenio de Cooperación entre el Ministerio de Salud del Perú y la Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional, USAID.

