


## PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960


**MET-CNSP-068**

<b>Elaborado por :</b>	CNSP	Blga. Miriam Alarcón León
	CNSP	Blga. Carmen Osorio Mejía
<b>Revisado por :</b>	CNSP	Blgo. Eddy Valencia Torres
		Blga. Gabriela Salinas Coronel
<b>Aprobado por:</b>	CNSP	Méd. Luis Vergara Fernández
RD N°	201 -2016-DG-CNSP/INS	Fecha: 01/ 08 /2016

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

## INDICE

	<u>Pág.</u>
1. ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
2. REFERENCIAS	3
3. DEFINICIONES OPERATIVAS	4
4. FUNDAMENTOS DEL MÉTODO	5
5. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO	5
6. CÁLCULOS	17
7. INFORME DE RESULTADOS	17
8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	17
9. FORMULARIO	19
10. ANEXOS	19


	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

## 1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método descrito se aplica al cultivo líquido positivo MGIT y muestras de aislamientos de *M. tuberculosis* detectados en medios sólidos (Lowenstein-Jensen y Ogawa) recepcionados en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) del Centro Nacional de Salud Pública (CNSP) del Instituto Nacional de Salud (INS).

## 2. REFERENCIAS

- 2.1 EXT-CNSP-224: BACTEC™ MGIT 960™ System User's Manual.
- 2.2 EXT-CNSP-027: BD BBL™ TM MGIT™ 960 SIRE Kits. For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis.
- 2.3 EXT-CNSP-027. Inserto Kit BACTEC MGIT 960 SIRE. Para el análisis de sensibilidad antimicrobiana de Mycobacterium tuberculosis.
- 2.4 EXT-CNSP-029. Inserto Kit BACTEC MGIT 960 PZA. Para el análisis de sensibilidad antimicrobiana de Mycobacterium tuberculosis.
- 2.5 EXT-CNSP-025, BD MGIT TBc Identification Test.
- 2.6 EXT-CNSP- 305 Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte II Cultivo. 2008. OPS.
- 2.7 WHO. Policy guidance on drug-susceptibility testing (DST) of second-line antituberculosis drugs. WHO/HTM/TB/2008.392
- 2.8 WHO REPORT 2009.Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing "WHO/HTM/TB2008.393. Disponible: [www.who.int/tb/publication/global\\_report/2008/en/index.html](http://www.who.int/tb/publication/global_report/2008/en/index.html)L-23k.
- 2.9 Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2013. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92661/1/9789243504636\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92661/1/9789243504636_spa.pdf).
- 2.10 MAN-CNSP-002: Medidas de bioseguridad para la contención biológica en las instalaciones con nivel de bioseguridad 3 del laboratorio de microbiología y biomedicina del centro nacional de salud pública/INS.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

### 3. DEFINICIONES OPERATIVAS

**Cultivo:** Obtención de una población de microorganismos procedentes de una sola célula viable, contiene solo una especie o una cepa. En medios sólidos obtenemos colonias aisladas que provienen de una unidad formadora de colonias (UFC) o células viables.

**Control de calidad:** Medidas internas y externas adoptadas para garantizar la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba


**Lowenstein-Jensen:** medio de cultivo a base de huevo usado para el aislamiento de micobacterias y en la prueba de susceptibilidad a medicamentos antituberculosis.

**Ogawa:** medio de cultivo a base de huevo usado para el aislamiento de micobacterias

**Contaminación:** Crecimiento de otros microorganismos en el aislamiento de *M. tuberculosis*.

### SIGLAS

- MTB** : *Mycobacterium tuberculosis*
- CMTB** : Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
- BAAR** : Bacilo Ácido Alcohol Resistente.
- CSB** : Cabina de Seguridad Biológica.
- LJ** : Lowenstein-Jensen.
- TB** : Tuberculosis.
- CC** : Control de calidad.
- E** : Etambutol.
- I** : Isoniacida
- LJ** : Lowenstein-Jensen
- MGIT** : Mycobacteria growth indicator tube
- R** : Rifampicina
- S** : Estreptomina.
- PZ** : Pirazinamida.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

**SIRE** : Estreptomicina, Isoniacida, Rifampicina, Etambutol.

**EPP** : Equipo de protección personal.

#### 4. **FUNDAMENTO DEL MÉTODO**


El MGIT (Mycobacteria growth indicator tube) contiene caldo Middlebrook 7H9 y una base de pentahidrato de rutenio como indicador del desarrollo. Al hacer incidir luz UV emitida por el equipo, el indicador emite fluorescencia si algún microorganismo con metabolismo activo ha consumido O<sub>2</sub>. De esta manera es posible detectar si *Mycobacterium tuberculosis* desarrolla o no en presencia de un antibiótico.

El método mantiene el principio del método de las proporciones al emplear como control el inóculo diluido 1:100 sembrado sin antibiótico para SIRE y 1:10 para PZ. . De esta forma, si se detecta señal en el tubo sin y con droga, se infiere que existe desarrollo de más del 1% de clones resistente a la droga.

#### 5. **DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO**

##### 5.1. **Aspectos de bioseguridad**

- El Laboratorio de Micobacterias, corresponde al Nivel de Bioseguridad III, se aplican medidas estrictas de bioseguridad, con equipos de contención primaria, elementos de protección personal (EPP) como uso de mameluco, gorro, bata, cubre calzado, doble par de guantes (guantes nitrilo y guantes de látex), respirador N95.
- Todos los procedimientos que incluyen la manipulación de materiales infecciosos deben ser realizados cuidadosamente y desarrollados dentro de la CSB, con el objetivo de minimizar la producción de aerosoles.
- Para las medidas de bioseguridad se sigue las instrucciones del MAN-CNSP-002: medidas de bioseguridad para la contención biológica en las instalaciones con nivel de bioseguridad 3 del laboratorio de microbiología y biomedicina del centro nacional de salud pública/INS.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

## 5.2. Condiciones previas

- El laboratorio debe contar con equipos tales como: Micropipetas, autoclave, incubadoras y cabinas de seguridad biológica clase II, Tipo A2 con programa de mantenimiento preventivo establecido.
- No utilizar los dispositivos después de su fecha de caducidad.
- No reutilizar el dispositivo.
- Utilizar una punta (tips con filtro) de micropipeta limpia y estéril para cada muestra.
- Conservación y manipulación: Los dispositivos de análisis pueden conservarse a 2 – 35 °C. NO CONGELAR. En el momento en que se va a realizar el análisis, los dispositivos deben estar a temperatura ambiente.

### 5.2.1 Muestra

Cultivo puro de *M. tuberculosis* en medio de cultivo sólido en fase de crecimiento logarítmico de tres a cuatro semanas de crecimiento, contadas a partir de la siembra y que tenga más de 10 colonias. Cultivo líquido en fase de crecimiento logarítmico.


### 5.2.2 Conservación de muestras en el laboratorio antes y después del análisis:

Las cepas están ordenadas cronológicamente de acuerdo a su llegada y se conservan dentro del laboratorio a la temperatura de medio ambiente.

## 5.3. Equipos, materiales e insumos

### Equipos


- Cabina de bioseguridad de Clase II, Tipo A o B.
- Equipo Bactec MGIT 960
- Vortex
- Autoclave.
- Refrigeradora (4 – 8 °C).

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

- Micropipetas automáticas (100 µL, 200µL y 1000µL).
- Incubadora (37°C±1°C)

### **Materiales**

- Pipetas serológicas de 1 y 10 mL.
- Propipetas de jebe de 50 mL
- Puntas de 100 µL, 200µL, 1000µL con y sin filtro.
- Crioviales de 1.5 mL.
- Espátulas de acero inoxidable
- Marcadores para vidrio punta fina
- Bolsa de bioseguridad autoclavable.
- Papel absorbente plastificado.
- Alcohol 70%
- Gasa
- Bandeja de acero inoxidable tipo fuente
- Caja de acero inoxidable
- Tubos de 12 X 120 mm con tapa a rosca
- Gradillas (soportes) de polipropileno para tubos de 12 x 120 mm
- Porta tubos (AST Set Carrier)
- Pipetas Pasteur descartables estériles o pipetas de transferencia.
- Pipeta automática capacidad 100 a 1000 µl
- Pipeta automática capacidad 10 a 200 µl
- Tips con filtro de 100 a 1000 µl con filtro.
- Tips con filtro de 10 a 200 µl con filtro.
- Mc Farland N° 0.5
- Tubos de vidrio 15 X 100 con tapa de rosca.
- Desinfectante tuberculosa (ortofenilfenol y amilfenol terciario)
- Agua destilada estéril

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

#### Reactivos y soluciones

- BD BBL™ MGIT™ Tubo MGIT con 7mL de medio
- BD BBL™ MGIT™ Tubo MGIT con 7mL de caldo 7H9 modificado para PZ
- Kit BACTEC MGIT 960 SIRE contiene frascos individuales de antibióticos liofilizados:
  - MGIT Estreptomina (MGIT-S): 332 ug
  - MGIT Isoniacida (MGIT-I): 33,2 ug
  - MGIT Rifampicina (MGIT-R): 332 ug
  - MGIT Etambutol (MGIT-E): 1660 ug
  - Suplemento OADC (ácido oleico, albúmina bovina, dextrosa y catalasa)
- Kit BACTEC MGIT 960 PZ contiene frascos individuales de antibióticos liofilizados:
  - MGIT Pirazinamida (MGIT- PZA): 100 ug
  - Suplemento de crecimiento BACTEC MGIT 960 PZ contiene 15mL de suplemento.


#### 5.4. Procedimiento

##### 5.4.1. Etapa pre analítica

##### 5.4.1.1. Preparación de medio con drogas SIRE

- Reconstituir los frascos con los antibióticos liofilizados del kit BACTEC MGIT 960 SIRE con 4 mL de agua destilada estéril para preparar una solución stock. (solución stock S, I, R y E). Mezclar vigorosamente y verificar que las drogas estén completamente disueltas.
- Rotular y alicuotar las drogas reconstituidas en frascos de 0,2 - 0,5 mL. Si se realiza prueba de sensibilidad ese día separar una alícuota de cada droga y congelar el resto a -20°C hasta 6 meses.
- Rotular cinco tubos MGIT de 7 mL para cada cultivo líquido o cepa aislada analizada: uno como C (control de crecimiento), uno como S, uno como I, uno como R y uno como E y se colocarán según la secuencia en el carrier.




	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

- Empleando una micropipeta, agregar asépticamente 0,8 mL de suplemento de crecimiento OADC a cada tubo rotulado como SIRE.
- Empleando una micropipeta, se agregará 100 µl de droga reconstituida de S al tubo rotulado S, luego agregar 100 µl de droga reconstituida de I al tubo I, 100 µl de droga reconstituida de R al tubo R y 100 µl de droga reconstituida de E al tubo E; es importante agregar el antibiótico apropiado al tubo correspondiente.
- Descartar lo que no se utiliza de la alícuota con droga.

DROGA	SOLUCIÓN STOCK (luego de agregar 4 mL de agua)	CONCENTRACIÓN FINAL En el tubo MGIT
S	MGIT S: 83 µg/mL	1.0 µg/mL
I	MGIT I: 8.3 µg/mL	0,1 µg/mL
R	MGIT R: 83 µg/mL	1,0 µg/mL
E	MGIT E: 415 µg/mL	5.0 µg/mL

#### 5.4.1.2. Preparación de medio con droga PZA.

- Reconstituir con 2,5 mL de agua destilada estéril, cada frasco con drogas (solución stock PZA). Mezclar vigorosamente y verificar que la droga esté completamente disuelta.
- Si se realiza prueba de sensibilidad ese día separar una alícuota de cada droga y congelar el resto a -20°C hasta 6 meses.
- Rotular dos tubos MGIT de 7mL de caldo modificado PZ para cada cultivo líquido o cepa aislada analizada: uno como C para control de crecimiento sin droga y uno como PZ, colocarlos en la secuencia correcta en el carrier.
- Con una micropipeta, adicionar 0,8 mL suplemento de crecimiento OADC en cada tubo MGIT PZA.
- Con una micropipeta, agregar 100 µl de la solución de PZA al tubo rotulado PZA.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

- Descartar lo que no se utiliza de la alícuota con droga.

DROGA	SOLUCIÓN STOCK (luego de agregar 2,5 mL de agua)	CONCENTRACIÓN FINAL En el tubo MGIT
PZA	MGIT PZA: 8000 µg/mL	100µg/mL


#### 5.4.2. Etapa analítica

##### 5.4.2.1. Preparación del inóculo para la prueba de sensibilidad

El inóculo puede prepararse a partir de un medio líquido de un tubo BACTEC MGIT positivo y de cultivos puros de MTB confirmados mediante técnicas de identificación (test inmunocromatográfico), para asegurarse que el cultivo que se va a analizar es un cultivo puro.

##### a. Preparación del inóculo a partir de un tubo BACTEC MGIT de 7mL positivo:

- El primer día en que el equipo detecta un resultado positivo para un tubo MGIT se considera el día 0, el tubo será incubado un día más (día 1) antes de ser utilizado para la prueba de sensibilidad (se puede incubar a 37°C +1°C).
- Un tubo positivo puede ser utilizado para probar la susceptibilidad al fármaco hasta el quinto día después que el equipo da como positivo. Un tubo que ha sido positivo más de 5 días, se subcultivará en un nuevo tubo MGIT de 7mL que contenga suplemento para crecimiento BACTEC MGIT, analizarlo en el instrumento BACTEC MGIT hasta que muestre positividad y utilizarlo de uno a cinco días después de mostrar positividad.
- Si el tubo es positivo los días 1 ó 2, utilice el caldo de suspensión MGIT para los procedimientos de inoculación. Mezclar bien. Continuar con el "Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad".


	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

- Si el tubo es positivo los días 3, 4 ó 5, mezclar bien y diluir 1 mL del caldo positivo en 4 mL de agua destilada estéril (dilución de 1:5). Mezcle bien el tubo. Utilizar la suspensión diluida para los procedimientos de inoculación. Continuar con el “Procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad”.

**NOTA:** Es importante preparar el inóculo utilizando las referencias de tiempo presentadas a continuación para obtener la concentración apropiada del microorganismo para el análisis de sensibilidad.

**b. Preparación del inóculo a partir de medios sólidos:**

- Con una espátula de siembra separar el mayor número posible de colonias de un cultivo de 30 días como máximo, procurando evitar coleccionar medio sólido y poner en suspensión las colonias en 4 mL agua destilada estéril o en caldo Middlebrook 7H9.
- Agitar la suspensión en un agitador vortex durante 15seg para dispersar los grumos más grandes. La turbidez de la suspensión debe superar el patrón 1,0 de Mc Farland.
- Dejar que la suspensión repose durante 20min para precipitar los aerosoles generados.
- Utilizando una pipeta serológica de 1 mL o una pipeta de transferencia estéril de 3 mL, trasvasar el sobrenadante a un tubo con agua destilada estéril y estandarizar la suspensión bacteriana a escala patrón Mc Farland 0,5.
- Diluir 1 mL de la suspensión ajustada en 4mL de agua destilada estéril (dilución de 1:5). Continuar con el procedimiento de inoculación para el análisis de sensibilidad.
- Guardar las cepas originales en la estufa de 37°C hasta la liberación de los resultados.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

#### 5.4.2.2. Inoculación para el análisis de sensibilidad con el kit BACTEC MGIT 960 SIRE

##### a. Inoculación para el análisis de sensibilidad a partir cultivo sólido:


- Codificar los tubos controles MGIT de 7mL para cada cepa analizada.
- Colocar los tubos en la secuencia correcta para el conjunto AST.
- Con una micropipeta transferir 500 uL de la dilución 1:5 (Véase preparación del inóculo) a un tubo con agua destilada de 4.5 mL está será la dilución 1:10.
- A partir de la dilución 1:10 transferir 500 uL a un tubo con agua destilada de 4,5 mL siendo este la dilución 1:100.
- Con micropipeta, inocular 500 uL de la suspensión 1:100 en el tubo MGIT sin droga (Control "C").
- Con micropipeta inocular 500 uL de la suspensión 1:5 en cada uno de los tubos conteniendo las drogas (S, I, R y E)
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos por inversión suavemente entre tres y cuatro veces.

##### b. Inoculación para el análisis de sensibilidad a partir cultivo MGIT positivo:

- Codificar los tubos controles MGIT de 7mL para cada cepa analizada.
- Colocar los tubos en la secuencia correcta para el conjunto AST.

##### Aislamiento en MGIT del día 2:

- Con una micropipeta transferir 500 uL del tubo MGIT positivo a un tubo con 4.5 mL de agua destilada estéril (dilución 1:10).
- A partir de la dilución 1:10 transferir 500 uL a un tubo con 4,5 mL agua destilada estéril (la dilución 1:100).
- Con micropipeta, inocular 500 uL de la suspensión 1:100 en el tubo MGIT sin droga (Control "C").
- Con micropipeta inocular 500 uL de la suspensión del tubo MGIT positivo en cada uno de los tubos conteniendo las drogas (S, I, R y E)

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>


Aislamiento en MGIT del día 3,4 o 5:

- Con micropipeta transferir 1 mL del tubo MGIT positivo en 4mL de agua destilada estéril (dilución de 1:5).
- Con micropipeta transferir 500 uL de la dilución 1:5 a un tubo con agua destilada de 4.5 mL está será la dilución 1:10.
- A partir de la dilución 1:10 transferir 500 uL a un tubo con agua destilada de 4,5 mL siendo este la dilución 1:100.
- Con micropipeta, inocular 500 uL de la suspensión 1:100 en el tubo MGIT sin droga (Control "C").
- Con micropipeta inocular 500 uL de la suspensión 1:5 en cada uno de los tubos conteniendo las drogas (S, I, R y E)
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos cabeza-cola suavemente entre tres y cuatro veces.

**5.4.2.3. Inoculación para el análisis de sensibilidad con el kit BACTEC MGIT 960 PZA:**

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

- Codificar los tubos controles MGIT PZA de 7mL para cada cepa analizada.
- Colocar los tubos en la secuencia correcta para el conjunto AST.
- Con una micropipeta transferir 500 uL de la dilución 1:5 (Véase preparación del inóculo) a un tubo con agua destilada de 4.5 mL está será la dilución 1:10.
- Con micropipeta, inocular 500 uL de la suspensión 1:10 en el tubo MGIT PZA sin droga (Control).
- Con micropipeta inocular 500 uL de la suspensión 1:5 en el tubo con droga (PZA)
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos cabeza-cola suavemente entre tres y cuatro veces.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

**b. Inoculación para el análisis de sensibilidad a partir cultivo MGIT positivo:**


- Codificar el tubo control MGIT PZA de 7mL para cada cepa analizada.
- Colocar los tubos en la secuencia correcta para el conjunto AST.

*Aislamiento en MGIT del día 2:*

- Con micropipeta, inocular 500 uL de la suspensión del tubo MGIT positivo a un tubo con 4.5 mL de agua destilada estéril (dilución 1:10)
- Con micropipeta, inocular 500 uL de la dilución 1:10 en el tubo MGIT PZA sin droga (Control).
- Con micropipeta inocular 500 uL de la suspensión del tubo MGIT positivo en el tubo con droga (PZA).
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos cabeza-cola suavemente entre tres y cuatro veces.





*Aislamiento en MGIT del día 3,4 o 5:*

- Con micropipeta transferir 1 mL del tubo MGIT positivo en 4mL de agua destilada estéril (dilución de 1:5).
- Con micropipeta transferir 500 uL de la dilución 1:5 a un tubo con agua destilada de 4.5 mL está será la dilución 1:10.
- Con micropipeta, inocular 500 uL de la dilución 1:10 en el tubo MGIT PZA sin droga (Control).
- Con micropipeta inocular 500 uL de la dilución 1:5 en el tubo con droga (PZA)
- Ajustar la tapa y homogeneizar bien cada uno de los tubos con movimientos cabeza-cola suavemente entre tres y cuatro veces.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

#### 5.4.2.4. INGRESO DEL SET DE SENSIBILIDAD AL EQUIPO BACTEC MGIT 960:

##### Incubación:

- Colocar todos los tubos de SIRE y PZA procesados en los carriers.
- Registrar los códigos procedentes de los cultivos sólidos, de los cultivos positivos MGIT y código del carrier a la hoja de trabajo (base Excel de BACTEC) del laboratorio de micobacterias utilizando una lectora de código de barras, la fecha de proceso y finalmente el resultado del test de Inmunocromatografía (códigos procedentes de cultivo sólido).
- Ubicar en los porta tubos (AST *carrier*) ordenando los tubos de izquierda a derecha en la siguiente secuencia ( GC, STR, INH, RIF, EMB).
- Abrir uno de los compartimientos MGIT960, presionar el botón 
- Aproximar el código de barra del porta tubos al lector de código de barras que estará iluminado y luego hacer lo mismo con el código de la muestra procesada.
- Ubicar el porta tubos en las 5 estaciones iluminadas dentro del compartimento.
- Verificar que las drogas y concentraciones indicadas en la pantalla sean las correctas. Caso contrario apretar el botón  y buscar la droga y concentración adecuada pulsando   del lado derecho de la pantalla y apretar la tecla OK.
- Cerrar el compartimento.


#### ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

##### Control de calidad interno

Control de esterilidad de los medios y soluciones preparados:

##### Caldo Middlebrook 7H9

- Medio líquido (caldo 7H9) en tubos.
- Verificar que el caldo sea transparente, ligeramente amarillo.
- Seleccionar al azar 5 tubos de cada lote de medio recién preparado e incubar de 36° a 37°C, entre 48h a 72 horas.
- Verificar que los caldos incubados se mantengan transparentes.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

- Si presentan turbidez, indica contaminación, por lo que se descartará todo el lote.

#### **Manejo de cepas de referencia.**

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

- ✓ Cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv N° 27294 TMC N° 102.
- ✓ Cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37RV resist.a EMB N° 35837 TMC N° 350.
- ✓ Cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37RV resist.a INH N° 35822 TMC N° 303.
- ✓ Cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37RV resist.a RFP N° 35838 TMC N° 331

#### **Cepas atípicas genotipadas\***

- ✓ Cepa *Mycobacterium fortuitum*
- ✓ Cepa *Mycobacterium kansasii*.

\*Seleccionadas a partir de cepas identificadas por Biología Molecular, en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del INS.


El Control de Calidad Interno (CCI) se realiza según lo detallado en el ITT-CNSP-369.

#### **Control de calidad externo**

El laboratorio de Micobacterias participa en el programa de evaluación externa de la calidad.

Nombre del método	Nombre de la entidad evaluador externo	Frecuencia
Prueba de Susceptibilidad a Drogas Antituberculosas De Primera Línea por el Método BACTEC MGIT 960.	Laboratorio de Referencia Supranacional Massachusetts State Laboratory Institute (MSLI)	1 vez por año



	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

**6. CALCULOS**

No aplica

**7. INFORME DE RESULTADOS**

Los resultados se registran en el Sistema Informático NETLAB, se realiza la verificación del mismo. Los usuarios autorizados a través de la página Web del INS, pueden acceder al NETLAB, para visualizar los resultados e imprimir y entregar a su respectivo establecimiento.

**8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**


**Lectura, Registro y Verificación de Resultados:**


A. En el software BD EpiCenter


- Seleccionar el cuarto ícono (instrumentos del sistema) de la barra de herramientas, aparecerá una mini pantalla con los tres compartimentos.
- Seleccionar el compartimento que corresponda y aparecerá una pantalla con todos las pruebas que se encuentran en el equipo.
- Posicionarse en la prueba a retirar y presionar el botón derecho del *mouse*.
- En seguida saldrán los resultados de sensibilidad, estos deben ser colocados en la base Excel del laboratorio de micobacterias. Escribir S si es sensible y R si es resistente, tanto para SIRE como para PZA. De igual forma analizar las curvas de crecimiento.

B. En el equipo MGIT:

- Verificar diariamente la indicación de resultados finalizados en el equipamiento MGIT 960.
- La indicación puede ser positiva (señal +, luz roja) o error (signo de exclamación !, luz amarilla).
- Si tenemos compartimentos que muestran algunas señal, ir al software BD EPICENTER para verificar los resultados obtenidos proceder como se indica en el punto A.

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición N° 01</b>

- Luego de terminar de proceder lo descrito en el punto A, se deberá ir al equipo MGIT y abrir el compartimento que muestre alguna señal, deberá ser abierto. En ese momento aparecen en la pantalla los íconos indicativos de las actividades a realizar.
- Presionar el ícono 
- Retirar el *carrier* cuya estación estuviera iluminada, escanear su código de barras con el lector para liberarlo.
- Después de retirar todos los *carriers* de las pruebas finalizadas aparece OK en la pantalla, seguido una señal sonora (doble bip)
- Cerrar el compartimento.
- Comparar visualmente los resultados que se evidencia en los tubos BACTEC MGIT con los resultados reportados desde el software BD EPICENTER en la base Excel del laboratorio de micobacterias. Considerando el siguiente criterio:
  - ✓ Si el tubo control presenta flóculos y los tubos con droga son transparentes, validar el resultado de sensible
  - ✓ Si el tubo control y el tubo con droga con resultado resistente presentan flóculos, típicos de *M tuberculosis*, validar el resultado de resistente
  - ✓ Si algún tubo está turbio, sin flóculos, se sospecha contaminación. Hacer frotis. Si se observa flora no ácido alcohol resistente anular la prueba y repetirla a partir del aislamiento puro. Si se observan bacilos ácido alcohol resistentes disponer que se verifique si el cultivo contiene una micobacteria ambiental. En ese caso invalidar la prueba.
  - ✓ Repetir las pruebas que indiquen cualquier crecimiento en meseta en el tubo con droga hasta las 400 UC (resultado borderline o dudoso). Repetir la prueba a partir del tubo original.
- En caso de discordancia, repetir la prueba, de lo contrario se coloca EMITIR en la base Excel para que los resultados sean ingresados al NETLAB para su respectiva validación.
- Pruebas con los siguientes mensajes:
  - ✓ Prueba inválida: ocurre después de 14 días, cuando no hay crecimiento en el tubo control. Liberar el resultado como “no creció”. Tomar la cepa

	<b>MÉTODO DE ENSAYO</b>	<b>MET-CNSP-068</b>
	<b>PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS ANTITUBERCULOSIS DE PRIMERA LÍNEA POR EL MÉTODO BACTEC MGIT 960.</b>	<b>Edición Nº 01</b>

original en MGIT; incubar dentro del equipo como tubo independiente para intentar recuperarla. Después de la incubación si hubiera crecimiento, repetir la prueba.

- ✓ Cuando se libera el segundo resultado colocar la observación que la cepa fue recuperada.
- ✓ Umbral positivo /prueba invalida: crecimiento rápido; significa exceso de inculo o MNT de crecimiento rápido o contaminación. Hacer un frotis del tubo control. Si se observa flora no ácido alcohol resistente repetir la prueba a partir del aislamiento puro. Si se observan bacilos ácido alcohol resistente mandar a identificar la cepa a partir de tut

**9. FORMULARIO**

FOR-CNSP- 217: Hoja de trabajo de Susceptibilidad del Método BACTEC MGIT 960.

FOR-CNSP- 232: Registro Control de Calidad Interno del Método BACTEC MGIT 960.

**10. ANEXOS:**

Ninguno.