

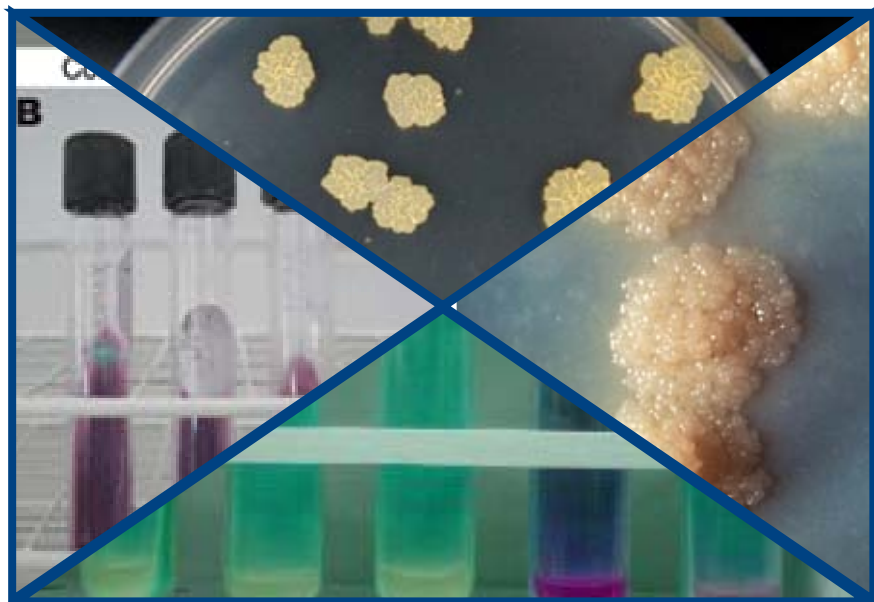


PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

MÉTODO DE NITRATO-REDUCTASA (GRIESS) PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ISONIACIDA Y RIFAMPICINA



Lima, 2011

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ

MINISTRO

Alberto Tejada Noriega

VICEMINISTRO

Enrique Jacoby Martínez

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ALTA DIRECCIÓN

Jefe

Percy Minaya León

Subjefe

Nora Reyes Puma

ÓRGANOS DE LÍNEA

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición

Director General
Wilfredo Salinas Castro

Centro Nacional de Control de Calidad

Director General
Ruben Tabuchi Matsumoto

Centro Nacional de Productos Biológicos

Director General
Alberto Valle Vera

Centro Nacional de Salud Intercultural

Director General
Oswaldo Salaverry García

Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Ambiente para la Salud

Directora General
Estela Ospina Salinas

Centro Nacional de Salud Pública

Director General
Pedro Valencia Vásquez

ÓRGANOS DE ASESORAMIENTO

Oficina General de Asesoría Técnica

Director General
José Cárdenas Cáceres

Oficina General de Asesoría Jurídica

Directora General
Kirla Echegaray Alfaro

Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica

Director General
Manuel Espinoza Silva

ÓRGANOS DE APOYO

Oficina General de Administración

Director General
José Arróspide Aliaga

Oficina General de Información y Sistemas

Director General
Javier Vargas Herrera

COMITÉ EDITOR INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

PRESIDENTE

César Cabezas Sánchez

MIEMBROS

Rosario Belleza Zamora
Zuño Burstein Alva
Daniel Cárdenas Rojas
Flor Fuentes Paredes
Lucio Huamán Espino
Charles Huamani Saldaña
Oswaldo Salaverry García
Diana Vergara Núñez
Liliana Vigil Romero
Javier Vargas Herrera

Secretaría Técnica

Bertha Huarez Sosa

PROGRAMA DE APOYO A LA REFORMA EN EL SECTOR SALUD - PARSALUD II

Coordinadora General
Paulina Giusti Hundskopf

Coordinador Técnico
Walter Vigo Valdez

Coordinadora del Proyecto Octava
Ronda Fondo Mundial
Rosa Inés Béjar Cáceres

Especialista en Laboratorio
Jessica Alvarado Guerrero



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

MÉTODO DE NITRATO-REDUCTASA (GRIESS) PARA LA DETECCIÓN RÁPIDA DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ISONIACIDA Y RIFAMPICINA

ELABORADO POR:

Luis Asencios Solís
Coordinador
Laboratorio de Micobacterias
Centro Nacional de Salud Pública/ Instituto
Nacional de Salud

Alexander Sloutsky, Ph.D.
Director del Laboratorio de Micobacteriología
Massachusetts State Laboratory Institute,
Estados Unidos

Marcia Stowell, Ed.M., MT(ASCP),
Directora de Extensión del Laboratorio
Massachusetts State Laboratory Institute,
Estados Unidos.

LIMA, 2011

Asencios Solis, Luis ; Sloutsky, Alexander y Stowel, Marcia
Método de nitrato-reductasa (GRIESS) para la detección rápida de la susceptibilidad a isoniácida y rifampicina / Elaborado por Luis Asencios Solís, Alexander Sloutsky y Marcia Stowel. -- Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2012.
36 p. : il., tab. 14.5 x 22.5 cm.

1. NITRATO-REDUCTASA 2. ISONIAZIDA 3. RIFAMPIN 4. TUBERCULOSIS
RESISTENTE A MÚLTIPLES MEDICAMENTOS 5. PERÚ

- I. Asencios Solís, Luis
- II. Sloutsky, Alexander
- III. Stowel, Marcia
- IV. Instituto Nacional de Salud (Perú)
- V. Perú. Ministerio de Salud

ISBN: 978-612-310-001-8

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N.º 2012-01041

Tiraje: 700 ejemplares

1ra. edición

© Ministerio de Salud, 2012

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

Teléfono: (511) 431-0410

Telefax: 01 – 3156600 anexo 2669

Página web: www.minsa.gob.pe

© Instituto Nacional de Salud, 2012

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: 617-6200

Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe

Página Web: www.ins.gob.pe

Norma Técnica aprobada con Resolución Jefatural N.º 387-2011-J-OPE/INS

Diseño y diagramación: Segundo Eliades Moreno Pacheco

Corrección de estilo: Lic. Daniel Cárdenas Rojas

La versión electrónica de este documento se encuentra disponible en forma gratuita en www.ins.gob.pe

Este Manual ha sido desarrollado en el marco del Proyecto "Haciendo la diferencia: consolidando una respuesta amplia e integral contra la Tuberculosis en el Perú" Octava Ronda Fondo Mundial - Componente Tuberculosis bajo los términos de donación (Acuerdo de Subvención PER-809-G07-T suscrito entre el Ministerio de Salud y el Fondo Mundial - Receptor Principal PARSALUD II) Primera Fase.

Se autoriza su reproducción total o parcial, siempre y cuando se cite la fuente.

ÍNDICE

1.	Introducción	7
2.	Objetivo	8
3.	Ambito de aplicación	8
4.	Definiciones y siglas	8
5.	Responsabilidades	10
6.	Fundamento del método	10
7.	Equipos y materiales	11
8.	Desarrollo del método Griess	13
	8.1 Etapa preanalítica	13
	8.2 Recolección de la muestra	15
	8.3 Selección de la muestra	15
	8.4 Etapa analítica: procedimiento	17
	8.5 Lectura de prueba	18
	8.6 Interpretación de resultados	19
	8.7 Reporte de resultados	19
	8.8 Confiabilidad del método	20
	8.9 Evaluación de desempeño del método	20
9.	Referencias bibliográficas	21
10.	Anexos	22
	Anexo A. Procedimiento de digestión y descontaminación	
	Anexo B. Algoritmo del flujo de muestra para Griess y PSF (LJ y APP)	
	Anexo C. Preparación medio Lowenstein-Jensen (con y sin fármaco)	
	Anexo D. Preparación acuosa verde de Malaquita 2%.	
	Anexo E. Preparación solución acuosa de nitrato de sodio (NaNO_3)	
	Anexo F. Preparación de solución <i>stock</i> de isoniacida.	
	Anexo G. Preparación de solución <i>stock</i> , e incorporación de RIF al medio de cultivo.	
	Anexo H. Preparación de la solución de digestión y descontaminación	
	Anexo I. Preparación <i>buffer</i> fosfato.	
	Anexo J. Preparación de fenol acuoso concentrado	
	Anexo K. Preparación de solución del reactivo Griess	
	Anexo L. Control de calidad del medio Lowenstein-Jensen	
	Anexo M. Control de calidad para el método Griess	
	Anexo N. Indicación es para baciloscopía en los centros de salud y en los laboratorios de la DISA.	

SECTOR SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



N° 387-2011-J-OP/INS

RESOLUCIÓN JEFATURAL

Lima, 22 de diciembre de 2011

VISTO:

El Informe N° 199 – 2011 – DG – CNSP / INS, de fecha 22 de diciembre del 2011 del Centro Nacional de Salud Pública, que alcanza los Manuales de Procedimientos de Laboratorio; y

CONSIDERANDO:



Que, mediante Decreto Supremo N° 001-2003-SA, del 09 de enero del 2003, se aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud, el cual señala entre sus objetivos funcionales, fortalecer la capacidad de diagnóstico en el ámbito nacional para la prevención y control de riesgos y daños asociados a las enfermedades transmisibles y no transmisibles, así como fortalecer el sistema de control de calidad de los alimentos, productos farmacéuticos y afines, como organismo de referencia nacional;



Que, de acuerdo a lo establecido en el artículo 36° del mismo texto normativo, el Centro Nacional de Salud Pública, es el órgano de línea del Instituto Nacional de Salud, encargado de normar, desarrollar, evaluar y difundir de manera integral la investigación en salud pública y las tecnologías apropiadas para la prevención y el control de las enfermedades transmisibles y no transmisibles, aportando criterios técnicos para la formulación de políticas que orienten la atención de salud en el área de su competencia;



Que, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos de laboratorio para el diagnóstico de la TB-MDR, entre los cuales se encuentra el método colorimétrico de la nitrato reductasa conocido como el Método de Griess, que es una prueba rápida, costo-efectiva y confiable, basada en métodos convencionales de fácil aplicación y por tanto accesible a los laboratorios de la Red Nacional;



Que, la aplicación de dicho método permitirá examinar un gran número de muestras a fin de seleccionar aquellos pacientes que pudieran estar potencialmente infectados con *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (MDR) a los medicamentos;

Que, es finalidad del presente Manual, estandarizar y dar a conocer en forma clara y definida el Método de Nitrato –Reductasa (Griess) para la detección rápida de la susceptibilidad a Isoniacida y Rifampicina; lo cual contribuirá a incrementar los niveles de seguridad diagnóstica de la Tuberculosis;

Que, mediante documento del Visto, el Centro Nacional de Salud Pública alcanza entre otros el Manual denominado "Método de Nitrato – Reductasa (Griess) para la detección rápida de la susceptibilidad a Isoniacida y Rifampicina – V.01", para su aprobación por esta Jefatura Institucional;



Estando a lo propuesto por el Centro Nacional de Salud Pública, con el visto bueno de la Sub Jefatura, de la Oficina General de Asesoría Técnica y de la Oficina General de Asesoría Jurídica, y;

En uso de las atribuciones establecidas en el literal h) del artículo 12º y el artículo 36º del Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud aprobado por Decreto Supremo N° 001-2003-SA y en concordancia con lo dispuesto en la Directiva N° 001-INS/OGAT-V.02 "Directiva para la Elaboración, Revisión, Aprobación, Difusión, Actualización y Control de los Documentos Normativos del Instituto Nacional de Salud" aprobada mediante Resolución Jefatural N° 310-2010-J-OPE/INS;

SE RESUELVE:



Artículo 1º.- Aprobar el "Manual: Método de Nitrato – Reductasa (Griess) para la detección rápida de la susceptibilidad a Isoniacida y Rifampicina - V.01".

Artículo 2º.- Encargar a los Directores Generales, dentro del ámbito de su competencia, comunicar y difundir entre el personal a su cargo la presente Resolución.

Artículo 3º.- Encargar a la Oficina Ejecutiva de Organización, la difusión de la presente Resolución en el Portal de Normatividad Virtual.



Regístrese y comuníquese.



Percy
Percy Luis Minaya León
Jefe
Instituto Nacional de Salud



1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis multidrogorresistente (TB-MDR) es reconocida como una enfermedad infecciosa emergente con casos reportados en más de cien países alrededor del mundo. En las Américas, Perú muestra una de las tasas más elevadas de TB-MDR, con una prevalencia nacional de 5,4% entre los pacientes con TB nunca antes tratados, y 23,2 entre los pacientes previamente tratados.¹ Pese a que el tratamiento estandarizado acortado directamente observado (DOTS) fue apropiadamente implementado en el Perú desde los comienzos de la década de 1990, la TB-MDR continúa como uno de los mayores problemas de salud pública.

En los últimos años se ha desarrollado métodos nuevos de laboratorio para el diagnóstico de TB-MDR, pero no están al alcance de los países en desarrollo debido a que no disponen de infraestructura adecuada, equipamiento y por el alto costo de las pruebas.

Un método ideal puede ser uno simple, barato y confiable para ser implementado a nivel regional o intermedio de red de laboratorios con el fin de disminuir los tiempos en la obtención de los resultados.

Un método rápido para determinar la susceptibilidad a rifampicina e isoniacida que satisfaga estos criterios es el método colorimétrico de la nitrato reductasa conocido como el método de Griess², como una prueba barata que puede ser empleada en áreas de limitados recursos y de capacidad técnica no sofisticada, al estar basados exclusivamente en métodos convencionales y con materiales accesibles a cualquier laboratorio, tal como se describe en el presente manual.

2. OBJETIVO

Brindar un método rápido, confiable, sencillo y económico que permita examinar un gran número de muestras a fin de seleccionar a aquellos pacientes que pudieran estar potencialmente infectados con *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (MDR) a los medicamentos.

3. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método será aplicado en los laboratorios donde haya sido validado. La versión "directa" del método Griess debe ser usada por los laboratorios de la DISA como un método rápido de tamizaje para la detección de resistencia a isoniacida (INH) y rifampicina (RIF). Dicho método se aplicará a muestras respiratorias de pacientes primarios. Serán analizadas mediante este método solo aquellas muestras que tengan una carga bacteriana igual o mayor a BK+ (10-99 BAAR por cien campos), en base a la baciloscopia del frotis del esputo procesado. Los resultados serán confirmados de acuerdo al "Algoritmo del flujo de la muestra" anexo-B mediante la PS (APP) realizada en el Laboratorio de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud (INS). Aquellos resultados que requieran confirmación se considerarán como "preliminares" de acuerdo con el método Griess y se reportarán como tales.

4. DEFINICIONES Y SIGLAS

Fármacos de primera línea: medicamentos antituberculosos usados en el tratamiento primario (isoniacida, rifampicina, estreptomocina, etambutol, y pirazinamida).

Fármacos de segunda línea: medicamentos antituberculosos usados en el tratamiento de TB resistente (etionamida, kanamicina, capreomicina, ciprofloxacina, cicloserina, y otros medicamentos a medida que se encuentren disponibles)

Método de PS convencional: método de proporciones realizado en medio Löwenstein-Jensen.

Laboratorio de la DISA: Laboratorio de referencia de salud pública de la dirección de salud.

Muestras respiratorias: expectoración que proviene del árbol bronquial (esputos)

Baciloscopia indirecta: microscopia para la detección de BAAR en sedimento de muestras de esputo procesadas.

Sensibilidad de la prueba: es la capacidad para detectar a los verdaderos resistentes.

Especificidad de la prueba: es la capacidad para detectar a los verdaderos sensibles.

TB-MDR: tuberculosis multidrogorresistente, infección humana con cepas de *M. tuberculosis* que son resistentes a por lo menos INH y RIF simultáneamente.

Sensible: incapacidad que tiene la micobacteria de crecer en presencia de ciertas concentraciones de un fármaco antituberculoso.

Resistente: situación en la que la micobacteria que está siendo analizada crece en presencia de una concentración establecida de un fármaco antituberculoso.

Control de calidad (CC): medidas internas y externas adoptadas para garantizar la precisión y exactitud del procedimiento de la prueba.

Aseguramiento de la calidad: garantiza que todas las acciones necesarias de laboratorio se ejecuten de una forma tal que se logre mantener la excelencia; para garantizar la calidad, incluidas la preanalítica, analítica y postanalítica de la prueba.

Tiempo de demora: tiempo que transcurre desde el momento de recepción de la muestra en el laboratorio hasta el momento en que el laboratorio reporta los resultados.

Pacientes primarios: pacientes que no han sido previamente diagnosticados con TB y no han sido tratados con medicamentos antituberculosos.

SIGLAS

INS:	Instituto Nacional de Salud
LJ:	Medio Löwenstein-Jensen
PSD:	Prueba de sensibilidad a drogas antituberculosas
INH:	Isoniacida
RIF:	Rifampicina
TB:	Tuberculosis
APP:	Proporciones agar en placa
PSF:	Prueba de sensibilidad final
DISA:	Dirección de Salud
NALC:	N-Acetil L-Cisteina
UFC:	Unidad formadora de colonias
BAAR:	Bacilo ácido alcohol resistente
TB-MDR:	Tuberculosis multirresistente
CC:	Control de calidad
ESNPyCTB:	Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis

5. RESPONSABILIDADES

Realizarán esta prueba los profesionales del laboratorio que hayan sido capacitados en la aplicación de este método. El Laboratorio de Micobacterias del INS supervisará la parte de aseguramiento de la calidad en los laboratorios que se implementen este método.

6. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Este método utiliza la determinación de la actividad de la enzima nitrato reductasa de la bacteria que en cultivos de crecimiento activo de *M. tuberculosis* reduce el nitrato a nitrito y que se puede evidenciar por la formación de un color rojo grosella con el reactivo de Griess. Este cambio de color permite la detección temprana del crecimiento de *M. tuberculosis* al comparar los tubos controles sin fármacos con tubos que contienen fármacos antituberculosos. Los organismos sensibles crecerán y, de esta manera, desarrollarán un cambio de color en el medio sin fármaco, pero no crecerán en el medio con fármacos

y, por lo tanto, no producirán un cambio de color. Las cepas resistentes crecerán y cambiarán de color en tubos "control" sin fármacos y en tubos que contienen fármacos.

7. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Equipos

- Autoclave
- Balanza analítica y pesas certificadas
- Potenciómetro (medidor de pH)
- Cocinilla (*Hot-plate*) con barras de agitación magnéticas
- Coagulador (para la preparación de medios) (80-85 °C)
- Refrigeradora (4 °C)
- Congeladora (-20 °C y -70 °C)
- Baño María (37 °C)
- Centrífuga refrigerada
- Termómetros (0 a 100 °C)
- Jeringa dispensadora (10 mL)
- Cabina de bioseguridad de Clase II, Tipo A2
- Horno (60 °C)
- Microscopio binocular (10X* 100X)
- *Vortex Mixer*
- Micropipetas automáticas (1000 μ , 100 μ , 20 μ)
- Desecadores

Materiales

- Tubos de vidrio estériles con tapa rosca de 16 x 125mm
- Tubos de vidrio con tapa rosca de 20 x 150mm o 20 x 125 mm
- Tubos para centrífuga de 50 mL
- Pipetas serológicas de 1 mL
- Pipetas serológicas de 10 mL
- Probeta graduado de 500 mL

- Probeta graduado de 1000 mL
- Beaker de 2000 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- Matraz Erlenmeyer de 1000 mL
- Matraz Erlenmeyer de 2000 mL
- Propipetas de jebe de 50 mL
- Embudo de vidrio de 15 cm de diámetro
- Portatubos de 20 x 150 mm
- Portatubos de 16 x 125 mm
- Baguetas de vidrio o batidor de acero inoxidable
- Crioviales de 2 mL
- Gasa estéril
- Pita o pabilo
- Papel *Kraft*
- Plumón indeleble
- Cinta indicadora para autoclave
- Cinta indicadora para horno
- Parafilm "M"
- Papel aluminio
- Papel *glycine*
- Microespátulas de acero inoxidable
- Tubos de polipropileno de base cónica estériles de 50 mL de tapa rosca
- Bandeja de acero inoxidable tipo fuente
- Bandejas de acero inoxidable para veinte tubos
- Gradillas de polipropileno para tubos de 50 mL
- Caja de acero inoxidable
- Portaobjetos de vidrio
- Tips 1000 μ , 100 μ estériles
- Bolsas de bioseguridad 36 " x 24"

Reactivos

- Fosfato de potasio dihidrógeno anhídrido (KH_2PO_4)
- Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- Citrato de magnesio ($\text{C}_6\text{H}_6\text{MgO}_7$)
- L-Asparagina
- Glicerol PA
- Verde de Malaquita
- Huevos enteros (libres de antibióticos y que no tengan más de siete días)
- Detergente en polvo (OMS recomienda un jabón alcalino simple)
- Nitrato de sodio (NaNO_3)
- 70% v/v etanol
- Metanol puro (QP)
- Rifampicina (RIF), químicamente puro (Sigma Cat. R-3501).
- Isoniacida (INH), químicamente puro (Sigma Cat. I-3377).
- Ácido clorhídrico concentrado (HCl)
- Sulfanilamida ($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$)
- N-(1-Naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$) al 0.1% (w/v)
- N-Acetil-L-Cisteína ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\text{S}$)
- Hidróxido de sodio en lentejas (NaOH)
- Citrato de sodio $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Fosfato disódico (Na_2HPO_4)
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Fucsina básica
- Azul de metileno
- Fenol critalizado PA

Otros insumos

- Agua destilada
- Huevos de gallina frescos
- Detergente alcalino en polvo
- Aceite de inmersión
- Papel lente

8. DESARROLLO DEL MÉTODO GRIESS

8.1 ETAPA PRE ANALÍTICA

8.1.1 Área de preparación del medio

- El ambiente y la mesa de trabajo deben estar limpio y todos los materiales deben estar esterilizados.
- Evite abrir y cerrar puertas, así como la circulación del personal durante la preparación del medio.
- Utilizar una cabina de bioseguridad clase II, tipo A 2, para proteger el medioambiente.
- Para desinfectar la mesa de trabajo utilizar etanol al 70% (v/v) o 3% (v/v) de hipoclorito de sodio.
- Los desinfectantes deben ser recién preparados (no utilizar soluciones preparadas con más de 24 horas).

8.1.2 Área de procesamiento de las muestras

- El personal debe usar equipos de protección personal: batas, guantes, respiradores, gorros y botines.
- Utilizar una cabina de bioseguridad de clase II, tipo A2, para reducir el riesgo de infección por aerosoles.
- Aplicar medidas de buenas prácticas de laboratorio, para minimizar el potencial de infección del personal en caso de accidentes (rotura de tubo durante la centrifugación). Estas precauciones incluyen:
 - Utilizar una centrífuga refrigerada de pie con tapa y un rotor de ángulo fijo(la masa del rotor de ángulo fijo permite la centrifugación de los tubos con pequeñas diferencias de peso sin causar vibraciones y posible rotura de los tubos).
 - Asegurar que todos los tubos en la centrífuga se encuentren balanceados y cerrados herméticamente.
 - Utilizar las tapas de seguridad del contenedor de la centrífuga.

8.1.3 Mantenimiento preventivo y correctivo de los equipos

Se deberá realizar el mantenimiento y la calibración de rutina de la balanza analítica, la estufa-incubadora, la autoclave, la centrífuga refrigerada, el potenciómetro y las cabinas de bioseguridad, de acuerdo con el cronograma establecido por la institución.

8.2 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

- Todas las muestras de esputo deberán ser recolectadas en envases de plástico de boca ancha y tapa rosca, suministrados por la Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis (ESNPyCTB).
- Las muestras de esputo serán recolectadas en establecimientos de salud bajo la supervisión de trabajadores de salud capacitados, quienes instruirán a los pacientes sobre la forma de obtener la muestra de esputo adecuada, durante la consulta con el médico (primera muestra) y la segunda muestra tomada en la mañana siguiente después de la consulta. Las muestras deberán ser codificadas y transportadas siguiendo el protocolo establecido para la red de laboratorios. (Norma Técnica N.º 10. Manual de Normas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis, pp. 67, 1995 Lima-Perú.)

8.3 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

- Todas las muestras de esputo recolectadas de pacientes primarios sintomático respiratorio con riesgo de estar infectados con tuberculosis resistente o mutirresistente (MDR) que tengan como resultado baciloscopia positiva del esputo con una carga bacteriana igual o mayor a una cruz (BK1+), pueden ser analizadas mediante el método Griess.
- Las muestras de esputo de pacientes con antecedentes de tratamiento previos (crónicos) y que están con esquemas estandarizados o individualizados no deben ser analizadas por este método.
- La cantidad mínima de muestra requerida es de 3 mL (3-5 mL de preferencia).
- Utilizar únicamente envases de plástico descartable de boca ancha y tapa rosca.

- En caso de que la muestra no se procese el mismo día de la recolección, deberá conservarse en refrigeración (4 a 8 °C) y ser enviada al laboratorio dentro de las 72 horas (tres días) de haber sido recolectada. Además, no deberá mantenerse sin refrigerar por más de cuatro horas.
- El laboratorio de la DISA, una vez que reciba la muestra, deberá procesarla por el método Griess dentro de las 72 horas. (Véase la “Política de triaje de muestras” que se describe más adelante).

Nota: cualquier variación de esta política deberá ser probada, validada y los resultados de dicha validación deberán ser informados antes de ser usados como resultados para el paciente.

Política de triaje de muestras para el método Griess: el método Griess tiene varios requisitos técnicos para las muestras. Los laboratorios que realizan esta prueba deben someter a triaje a sus muestras. Las muestras que no cumplen con los requisitos para el método Griess pueden ser procesadas por otro método alternativo.

Esta política de selección descalifica a algunas muestras para la prueba rápida mediante el método Griess. Sin embargo, se puede hacer el cultivo e identificación de rutina en los laboratorios de la DISA y la PS (APP) en el Laboratorio de Micobacterias del INS.

Las muestras no adecuadas para el método Griess o que requieren consideración especial pueden ser:

- Muestras que tiene baciloscopias menor que una cruz (BK 1+) en el esputo procesado (sedimento resuspendido).
- Muestras que tengan un volumen insuficiente (menos de 3 mL)
- Muestras que no fueron recolectadas en envases recomendados.
- Muestras que no fueron conservadas refrigeradas por más de cuatro horas o, si fueron refrigeradas, no fueron recibidas dentro de las 72 horas de haber sido recolectadas.
- El responsable del laboratorio deberá ser informado acerca de estas muestras y, a su vez, deberá notificar a los centros de salud que

proporcionaron las muestras acerca de su condición y brindar recomendaciones sobre el correcto envío de muestras. Si esto no fuera posible, la muestra puede ser analizada por otro método con las precauciones debidas respecto a la bioseguridad o identificación de los datos del paciente. Así mismo, cuando existan cuestiones de bioseguridad asociadas al transporte y manipulación de las muestras, se puede hacer un seguimiento para garantizar la seguridad del personal involucrado. Si estos incidentes fueran recurrentes, se deberá volver a capacitar al personal del centro de salud en aspectos de recolección y seguridad de las muestras.

- Muestras cuya bioseguridad pudiera haber sido afectada. Ej. envase con fugas.
- Muestras con información incompleta en la etiqueta o información que no concuerde con la documentación adjunta

8.4 ETAPA ANALÍTICA: PROCEDIMIENTO

Fundamento de la descontaminación

La N-Acetil-L-Cisteína (NALC) es un agente mucolítico utilizado para una rápida digestión del esputo. El hidróxido de sodio al 4% (w/v) es el agente descontaminante. El citrato de sodio 2,9% (w/v) se incluye en la mezcla de digestión para aglutinar los iones de metales pesados que podrían estar presentes en la muestra y que podrían desactivar la acetil cisteína. El acetil cisteína pierde su actividad rápidamente en solución, por lo que debe prepararse diariamente. Después de la digestión y de la descontaminación, el *buffer* fosfato estéril (0,067M, pH 6,8) se añade para minimizar la acción del NaOH y reducir la gravedad específica de las muestras antes de la centrifugación.

Digestión y Descontaminación

1. Trabajar las muestras en grupos iguales al número de tazas del rotor de la centrifuga (ej. ocho pacientes a la vez). Usando pipetas de vidrio de punta gruesa coloque de 3 a 5 mL de esputo en un tubo plástico de tapa rosca para centrifuga de 50 mL y añadir un volumen equivalente de la solución de NALC-NaOH, proporción 1:1.
2. Cerrar la tapa del tubo y mezclar en un vortex por aproximadamente diez segundos. Evitar la agitación excesiva para minimizar la oxidación y la inactivación de la N-acetil, L-Cisteina.

3. Mantener los tubos a temperatura ambiente por aproximadamente quince minutos para la descontaminación.
4. Añadir 0,067M *buffer* fosfato estéril (pH 6,8) al volumen total de 50 mL para minimizar la acción del NaOH y reducir la gravedad específica de la muestra antes de centrifugar.
5. Ajustar las tapas de los tubos y mezclar agitando o por inversión.
6. Centrifugar a 3000 x g por quince minutos utilizando una centrífuga refrigerada para evitar el sobrecalentamiento durante la centrifugación de las muestras.
7. Decantar el sobrenadante en un recipiente que contenga el desinfectante fenol 5% .
8. Añadir 1- 2 mL de *buffer* fosfato para resuspender el sedimento.
9. Realizar un frotis (usando una gota del sedimento resuspendido) siguiendo el protocolo estándar de laboratorio.
10. Después de obtener los resultados del frotis, solamente las muestras de esputo con una carga bacteriana igual o mayor a una cruz (BK1+) serán apropiadas para la prueba de sensibilidad rápida mediante el método Griess. Las muestras de esputo con una carga bacteriana menor a una cruz (bK1+) serán sometidas para el cultivo convencional y los métodos de PS.

Ejemplo: para cada esputo, preparar el siguiente juego de cinco tubos de medio L-J

3 tubos – control de crecimiento

1 tubo – con RIF

1 tubo – con INH

2 tubos – L-J para otras pruebas

11. Incubar a 37 °C (leer a los 14, 21 y 28 días, según sea necesario) (Ej. Si el control no es positivo a los 14 días, leer a los 21 días, etc.)

8.5 LECTURA DE LA PRUEBA

1. A los 14 días añadir 0,5 mL de reactivo Griess recién preparado en uno de los tubos “Control” y observar el cambio del color a rojo grosella.

2. Si no hay ningún cambio o hay cambio de color leve en el tubo “control”, incubar por siete días adicionales.
3. A los 21 días, repetir el paso (1) utilizando otro tubo “control”. Si en el tubo control no hay cambio de color o el cambio de color es muy leve, seguir incubando los tubos.
4. Cuando la intensidad del color sea evidente en el tubo “control”, añadir 0,5 mL del reactivo Griess a los tubos con el fármaco.
5. Comparar intensidad de color en el tubo que contienen el fármaco con los del tubo “control”.

8.6 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Se considera que un aislamiento es sensible a un determinado fármaco, si al comparar el tubo “control” con los tubos que contienen el fármaco, no se observa ningún cambio de color o el cambio es muy leve.
- Un aislamiento se clasifica como resistente a cierto fármaco si hay un cambio de color en el tubo que contiene el fármaco igual o mayor al del tubo “control”.
- La prueba no se considerará válida si hay muy poco o ningún cambio de color en el tubo de control (en este caso, estas muestras se deberán cultivar y enviar al INS para la prueba de susceptibilidad final (PSF).

8.7 REPORTE DE LOS RESULTADOS

- En el caso de los aislamientos resistentes a INH y RIF, se deberán emitir reportes preliminares que señalen claramente que estos resultados serán confirmados más adelante por la prueba sensibilidad final (PSF). Deberá haber un formulario único de notificación de resultados entre los laboratorios de la DISA y el laboratorio del INS. La notificación final contendrá ambos juegos de resultados y en caso de discrepancias se deberán incluir estipulaciones que permitan al INS (utilizando el método de APP para la PSF) reemplazar los resultados del laboratorio de la DISA.
- Para los aislamientos **sensibles** a uno o ambos fármacos, los resultados emitidos por la DISA se notificarán como informe final.

8.8 CONFIABILIDAD DEL MÉTODO

Por cada laboratorio que utilice el método Griess se llevará a cabo un estudio de validación y se dará a conocer la confiabilidad del método (sensibilidad y especificidad). En la sección de referencias se puede encontrar la confiabilidad de los resultados publicados. La sensibilidad y la especificidad que se encontró en el Laboratorio de Micobacterias del INS (estudio de validación inicial terminado en diciembre de 2003, se obtuvo una sensibilidad y especificidad de 99,1% y 100% para INH y 93,5% y 100% para RIF respectivamente)².

Sin embargo, es importante calcular la sensibilidad y la especificidad para cada laboratorio durante la validación inicial y se actualicen periódicamente.

8.9 EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO

Se calculará la sensibilidad y especificidad del método Griess en cada uno de los laboratorios de la DISA que participen de manera regular utilizando el protocolo de repetición de prueba (ver “CC Externo”) para la comparación de los resultados de la prueba Griess con los resultados presentados por el método de referencia (APP). Se registrarán tablas estándar 2x2 de la siguiente manera:

	Método de Referencia (APP) RESISTENTE	Método de Referencia (APP) SENSIBLE
Método Griess RESISTENTE	Verdadero Resistente (VR) a	Falso Sensible (FS) b
Método Griess SENSIBLE	Falso Resistente (FR) c	Verdadero Sensible (VS) d

La SENSIBILIDAD se calculará como $VR/(FR+VR)\%$

La ESPECIFICIDAD se calculará como $VS/(FS+VS)\%$

CC Externo: el desempeño de la prueba Griess deberá ser evaluado por el Laboratorio de Micobacterias del INS, cada año (comparándolo con el método APP) por cada laboratorio de la DISA y los resultados de esta evaluación deberán darse a conocer a los laboratorios.

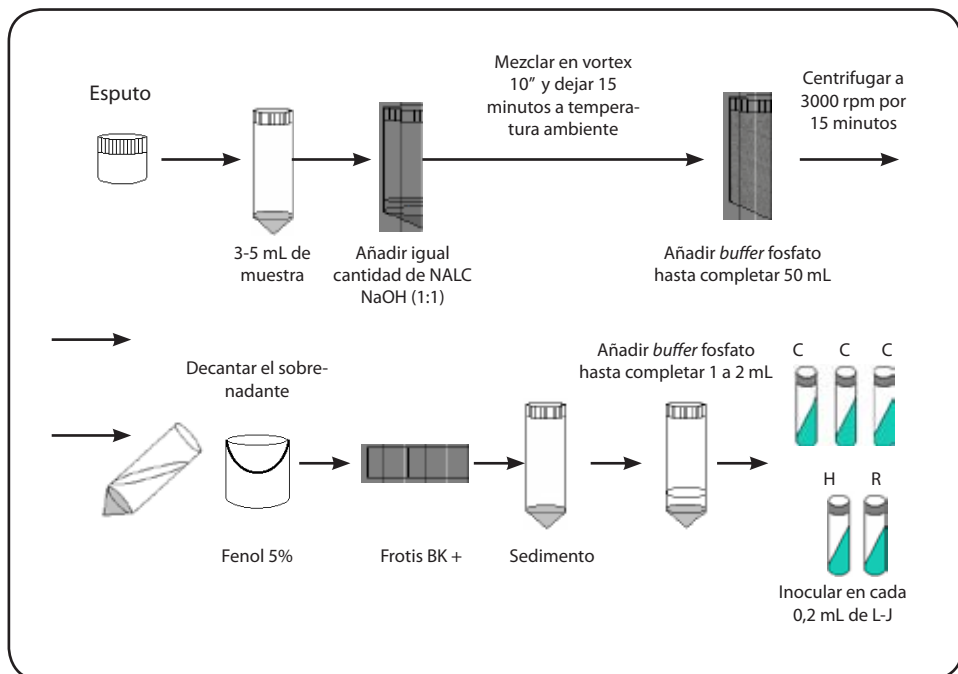
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Luis Asencios, Neyda Quispe, Alberto Mendoza-Ticona, Elena Leo, Lucy Vásquez, Oswaldo Jave, César Bonilla **VIGILANCIA NACIONAL DE LA RESISTENCIA A MEDICAMENTOS ANTITUBERCULOSOS, PERÚ 2005-2006**. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2009; 26(3): 278-87.
- 2- Solis, L. A., S. S. Shin, L. L. Han, F. Llanos, M. Stowell and A. Sloutsky (2005). "Validation of a rapid method for detection of M. tuberculosis resistance to isoniazid and rifampin in Lima, Peru." Int J Tuberc Lung Dis 9(7): 760-4.
- 3- Maria de Lourdes Shikama. (2009) Rapid detection of resistant tuberculosis by nitrate reductase assay performed in three settings in Brazil. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
- 4- Freddie Bwanga¹, Sven Hoffner, Melles Haile and Moses L Joloba . (2009) Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: A meta-analysis. BMC Infectious Diseases. 9:69.
- 5- Sunil SEIT y col. (2004). Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to primary antitubercular drugs by nitrate reductase assay. Indian J Med Res, 468-471 pp
- 6- K. A. Kristian Ångeby,¹ Lisbeth Klintz, and Sven E. Hoffner (2002). Rapid and Inexpensive Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a Nitrate Reductase Assay. Journal of Clinical Microbiology, p. 553-555
- 7- Angeby KA, L. L., Hoffner SE. (2002). „Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay." J Clin Microbiol 40(2): 553-5.
- 8- Golyshevskaja, V. I., A. A. Korneev, L. et al, (1996). "New microbiological techniques in diagnosis of tuberculosis." Propel. Tuberk 6: 22-25.

10. ANEXOS

Anexo A

Procedimiento de digestión y descontaminación



Anexo B

ALGORITMO DEL FLUJO DE LA MUESTRA PARA GRIESS Y PSF (LJ Y APP)

	Lugar	Operación	Resultado	Acción
1	Laboratorio de la DISA	Recibe la muestra		
2	Laboratorio de la DISA	Evalúa la muestra para determinar si es aceptable, incluyendo baciloscopia	Muestra no apropiada para Griess directo.	No utilizar el método Griess; realizar triaje usando otro método. Procesar el cultivo y PSF convencional con método LJ.
			Muestra apropiada para Griess directo.	Preparación para PSF con Griess para INH y RIF.
3	Laboratorio de la DISA	Se obtienen los resultados de Griess. Si el Método Griess no es válido (ej. no hay color en los tubos de control a los 28 días), utilizar el cultivo del esputo y enviar al Laboratorio del INS para la PSF (APP).	Resistente a: INH y RIF.	Los resultados se notifican como "preliminares" y enviar un cultivo al INS para la PSF de 1.ª y 2.ª línea por APP.
			Sensible a ambos fármacos o a uno de ellos	Los resultados se notifican como "finales".
4	Laboratorio de la DISA	Se obtienen resultados de la PSF convencional de 1.ª Línea (LJ) .	Resistente a: INH y RIF	Los resultados se notifican como "preliminares" y se envía un cultivo al INS para la PSF de 1.ª y 2.ª línea por APP.
			Sensible a ambos fármacos o a uno de ellos	Los resultados se notifican como "finales".
5	Laboratorio del INS	Recibe los subcultivos enviados desde el Laboratorio de la DISA que se analizaron ya sea por Método Griess o por método convencional LJ .		El laboratorio procesa la PSF para todo el panel de fármacos de 1.ª y 2.ª línea por el método APP.
			No se encuentran discrepancias	Los resultados de la PSF de 1.ª y 2.ª línea se reportan como "finales".
6	Laboratorio del INS	Se obtienen los resultados de la PSF de 1.ª y 2.ª línea y los resultados de la 1.ª línea se comparan con los resultados obtenidos en el Laboratorio de la DISA .	Se encuentran discrepancias en la PSF de 1.ª línea.	Se emite la notificación corregida que invalida los resultados "preliminares" de la PSF de 1.ª línea del Laboratorio de la DISA; se notifican los resultados de la PSF de 1.ª y 2.ª línea como finales (por el método APP)

Anexo C**Preparación de medio Lowenstein-Jensen (con y sin fármaco)**

Procedimiento para la preparación del medio L-J (con y sin fármaco)

Ingredientes**Solución de sales minerales**

Fosfato de potasio dihidrogeno anhídrido (KH_2PO_4)	2,4 g
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,24 g
Citrato de magnesio ($\text{C}_6\text{H}_6\text{MgO}_7$)	0,6 g
L-Asparagina (anhidra)	3,6 g
Glicerol	12,0 mL
Agua destilada	600,0 mL

- Disolver los ingredientes en orden en agua destilada calentar en baño María de aproximadamente 95-100 °C. Autoclavar a 121 °C durante quince minutos para esterilizar. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Esta solución se puede guardar refrigerada a 2 - 8 °C por hasta seis semanas.

Huevos enteros homogenizados

Preparar 1000 mL (aproximadamente 20-25 huevos, dependiendo del tamaño)

Los huevos de gallina deben ser frescos, lavar con una gasa y jabón alcalino simple. Enjuagar bien los huevos con agua corriente y limpiar con gasa estéril embebido en etanol al 70%. Dejar secar a medio ambiente. Romper los huevos de uno en uno y echar en un *beaker* de 2000 mL estéril; homogenizar con una varilla de vidrio o un batidor eléctrico a velocidad adecuada, para evitar la formación de burbujas. Filtrar por el embudo cubierto de gasa estéril de seis capas en un frasco Erlenmeyer estéril de 2000 mL.

Los siguientes ingredientes colocar asépticamente en un frasco erlenmeyer estéril, y mezclar bien:

Solución de sales minerales	600 mL
Huevos homogenizados	1000 mL

Solución de verde malaquita 2%	20 mL
Solución acuosa de nitrato de sodio	10 mL

Realizar la verificación del pH 6,7 a 7,0.

La suspensión resultante distribuir 6 mL por tubo en tubos de ensayo 16 x 125 mm con tapa rosca.

Coagulación del medio

Previamente calentar el coagulador a 80 - 85 °C. Colocar los tubos en posición inclinada en el coagulador. Coagular el medio por 45 minutos. Debido a que el medio ha sido preparado en condiciones estériles, este calentamiento sirve para solidificar el medio, no para esterilizar.

La calidad de los medios de huevos se deteriora cuando la coagulación se hace a altas temperaturas o durante un periodo prolongado. La decoloración del medio coagulado puede deberse a una temperatura excesiva. La aparición de pequeños agujeros o burbujas en la superficie del medio también pueden ser un indicador de condiciones de coagulación deficientes. Los medios de mala calidad deben ser descartados.

Control de esterilidad

Después de la coagulación, se debe incubar una muestra representativa de tubos de cultivo a 37 °C por 48 horas como parte del control o verificación de la esterilidad (ver Anexo C4).

Almacenamiento

Los medios recién preparados dejarlos enfriar a temperatura ambiente; luego colocar los tubos en bolsas de plástico, registrar la fecha y el número de lote y almacenar en refrigeración de 4 a 8 °C. Los medios pueden almacenarse hasta por cuatro semanas, las tapas de los tubos deben estar bien cerradas, para evitar que el medio se reseque.

Anexo D**Preparación de la solución acuosa de verde malaquita, 2% w/v
(preparar la solución nueva para cada lote de medio)**

- Verde malaquita 2,0 g
- Agua destilada estéril 100 mL

Disolver 2 g de la solución verde malaquita en un matraz estéril de 250 mL con 100 mL de agua destilada estéril. Colocar la solución en la incubadora a 37 °C por dos horas.

Nota: la solución podría precipitarse o cambiar de color con el tiempo. Por lo tanto, esta solución no debe almacenarse sino que debe usarse una nueva cada vez que se prepare el medio. Si se produce precipitación o cambio de color, desechar y preparar una solución nueva.

Anexo E**Preparación de solución acuosa de nitrato de sodio (NaNO_3)**

- Disolver 1,6 g en 10 mL de agua destilada.
- Autoclavar a 121 °C por quince minutos para esterilizar.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente. Esta solución se puede almacenar a 2 -8 °C por hasta cuatro semanas.

Anexo F**Preparación de la solución *stock* de isoniacida (INH).**

Usando una balanza analítica, pesar 100 mg de fármaco puro hasta la cuarta cifra decimal, colocar en un tubo con tapa rosca de 20 x 150 mm y disolver en 10 mL de agua destilada estéril. Una vez disuelto, preparar alícuotas de 1 mL por tubo usando tubos de polipropileno de 15 mL. La solución *stock* del fármaco no requiere esterilización. Las alícuotas deben almacenarse a -70 °C, y pueden usarse por un periodo de hasta seis meses. El contenido de una alícuota se debe usar solo una vez.

Preparación del medio LJ con INH

- Utilizando una pipeta serológica, añadir 1 mL de dilución B a un volumen de 500 mL de medio LJ y mezclar bien con movimientos circulares. Utilizando una jeringa dispensadora, distribuir 5 mL de medio en cada uno de los tubos de tapa rosca de 16 x 125 mm previamente esterilizados.
- El proceso de coagulación, los controles de calidad y el almacenamiento seguirán los mismos pasos que la preparación de los medios LJ.

Anexo G

Preparación de la solución *stock* de rifampicina (RIF)

Usando una balanza analítica, pesar 100 mg de fármaco puro hasta la cuarta cifra decimal, colocar en un tubo con tapa rosca de 20 x 150 mm, y disolver en 5 mL de metanol. Una vez disuelto el fármaco, preparar alícuotas de 1 mL por tubo usando tubos estériles de polipropileno de 15 mL. La solución *stock* del fármaco no requiere esterilización. Las alícuotas deben almacenarse a -70 °C y pueden usarse por un periodo de hasta seis meses. El contenido de una alícuota se debe usar sólo una vez.

Nota: No se requiere dilución de la solución *stock* de RIF.

Preparación del medio LJ con RIF

Usando una pipeta serológica, añadir 1 mL de la solución *stock* de rifampicina a un volumen de 500 mL de medio LJ, mezclar bien con movimientos circulares.

Usando una jeringa dispensadora, distribuir 5 mL de medio en cada uno de los tubos de tapa rosca de 16 x 125 mm previamente esterilizados.

El proceso de coagulación, los controles de calidad y el almacenamiento seguirán los mismos pasos que la preparación de medios L-J.

Anexo H

Preparación de la solución de digestión y descontaminación (NALC-NaOH)

Preparar los tres reactivos siguientes.

1. Preparar NaOH (ver la Tabla 1 para las cantidades necesarias)
2. Preparar la solución de citrato de sodio (ver la Tabla 1 para las cantidades necesarias)

- Mezclar el NaOH y el citrato de sodio (ver la Tabla 1 para las cantidades necesarias), esterilizar a 121 °C durante 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente en frascos para uso futuro.
- Añadir la cantidad requerida de NALC para completar el volumen total de la solución digestiva/descontaminante y utilizar dentro de las 24 horas.

Nota: la NALC no es estable en solución y puede perder su actividad mucolítica si se deja precipitar. Por lo tanto, el NALC-NaOH se deberá preparar y utilizar el mismo día (dentro de las 24 horas). No almacenar.

Tabla 1. Preparación de la solución digestiva-descontaminante (NALC-NaOH)

Volumen total (mL) de solución digestiva/ descontaminante a preparar	Cantidades necesarias (mL) de		NALC añadido (g)
	NaOH 4% w/v (*)	Citrato de sodio 2H ₂ O 2.9% w/v (**)	
50	25	25	0.25
100	50	50	0.50
200	100	100	1.00
500	250	250	2.50
1000	500	500	5.00

(*) Añada 4,0 g de NaOH a 100 mL de agua destilada.

(**) Añada 2,9 g de citrato de sodio dihidratado (o 2.6 g de citrato de sodio anhidro) a 100 mL de agua destilada.

Nota: ejemplo: para ocho esputos, preparar un volumen total de 50 mL de solución digestiva/descontaminante.

Anexo I

Preparación de *buffer* fosfato 0,067 M

- Preparar las soluciones *stock* A y B.
Fosfato disódico: diluir 9.47 g de Na₂HPO₄ en un litro de agua destilada (A).
Fosfato monopotasio: diluir 9,07 g de KH₂PO₄ en un litro de agua destilada (B).
- Para preparar el *buffer* (pH 6,8), mezclar 50 mL (A) con 50 mL (B) y medir el pH.
Si fuera necesario incrementar el pH, añadir la solución "A"; si fuera necesario reducirlo añadir la solución "B" hasta que se ajuste.

Anexo J

Preparación de fenol acuoso concentrado

- A. Preparación de fenol concentrado
- Añadir 100 mL de agua destilada al frasco original de 1 kg de fenol cristalizado.
 - Aflojar la tapa y calentar el frasco en baño María a 90 °C hasta que el fenol se disuelva por completo.
 - Retire el frasco del baño María y deje enfriar a temperatura ambiente (El fenol no se vuelve a cristalizar sino que permanece en su forma líquida).
 - Etiquetar y almacenar el frasco a temperatura ambiente.
- B. Preparación de la solución de fenol al 5% (v/v).
- Añada 5,5 mL del fenol concentrado a 94,5 mL de agua destilada (volumen total de 100 mL.) Esto equivale a 0,909 g/mL x 5,5 ml = 4,9995 g o 5,0 g fenol/100 mL.

Anexo K

Preparación de la solución del reactivo de Griess:

Poco antes del usar, mezclar:

- 1 parte del ácido clorhídrico (HCl) al 50% (v/v): Preparar 50 mL del concentrado HCl en 50 mL de agua destilada.
- 2 partes de la sulfanilamida al 0.2% (w/v)
- 2 partes de N-(1-Naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride(C₁₂H₁₄N₂·2HCl) al 0.1% (w/v)

Anexo L

Control de Calidad para medio LJ

1. Información general
 - a. Mantener el ambiente estéril como sea posible y minimizar el movimiento de las personas.

- b. El material de vidrio deberá estar bien lavado para eliminar cualquier sustancia que pueda alterar el pH del medio y, por ende, inhibir el crecimiento de la bacteria.
 - c. Todos los materiales empleados en la preparación del medio se deberán esterilizar en autoclave o en el horno (esterilización en seco) de acuerdo con los procedimientos de rutina.
 - d. Las superficies de trabajo se deberán limpiar con alcohol al 70% w/v antes de ser utilizadas.
2. Verificación del pH del medio

El pH del medio se verificará antes de la coagulación, el cual debe ser 6,6 - 6,8. Ajuste el pH según sea necesario usando HCl o NaOH. Después de la coagulación, se debe volver a verificar el pH al insertar la tira de pH en los medios coagulados. La coagulación incrementa el pH en 0,1 o 0,2. Por lo tanto, el pH debe estar entre 6,7 - 7,0. Si no se encuentra dentro de este rango, se deberá desechar el lote.
3. Inspección visual

Examine cuidadosamente el contenido de los tubos observando específicamente si hubiera inconsistencias, burbujas y cocimientos. Desechar cualquier medio inadmisibles. Si el 10% o más de los medios son inadmisibles, deseche todo el lote.
4. Verificación de la esterilidad

Incubar veinte tubos de medio de cultivo preparados a 37 °C por 48 horas para permitir que crezca cualquier contaminante. Los tubos se deberán cerrar herméticamente para prevenir la evaporación. Si no se detectan contaminantes bacterianos, colocar los tubos en la bolsa plástica y conservar en refrigeración. Si el índice de contaminación excede el 5% (más de un tubo), desechar el lote completo del medio preparado.
5. Verificación de la capacidad de mantener el crecimiento

Después de observar el desempeño de cada lote de medio, se deberá inocular y monitorear el crecimiento con la cepa ATCC, *M. tuberculosis* H37Rv.

Nota: esta verificación se deberá realizar en un plazo de 1 a 2 días después de preparar un nuevo lote de medios.

- A.** Preparación de la suspensión **STOCK1** de control H37 Rv.
1. Obtener un crecimiento abundante de la cepa H37 Rv sobre cualquier medio sólido.
 2. Utilizar un cultivo joven, de dos a tres semanas de incubación. Retirar una asa completa de masa bacteriana y resuspenderla en un tubo con 10 mL de caldo 7H9 o medio líquido PBS con *buffer*.
 3. Dejar el tubo completamente quieto durante 20 a 30 minutos para dejar que las partículas gruesas se sedimenten.
 4. Transferir 7 mL del sobrenadante y ajustar la turbidez al estándar 0,5 de McFarland.
 5. Preparar 7H9 en glicerol (mezclar 20 mL de glicerol en 80 mL de caldo 7H9).
 6. Diluir la suspensión ajustada del H37Rv a 1:1000 al transferir 0,1 mL de la suspensión (del paso 4) a un pequeño matraz con 100 mL de caldo 7H9 con glicerol (del paso 5). Guardar la suspensión restante para preparar la solución *stock* 2. La concentración final de glicerol será 20% v/v.
 7. Etiquetar los crioviales como: *STOCK* 1
 8. Alicuotar la suspensión diluida resultante del H37Rv en crioviales (1 mL cada uno) y conservar a -70°C .
- B.** Antes de utilizar, descongelar un criovial de *STOCK*1 e inocular 0,2 mL de la suspensión en 2-3 tubos inclinados con LJ (sin fármacos) "control de crecimiento" a un nuevo lote y de 2-3 tubos inclinados de un lote antiguo.
- C.** Incubar 21 días a 37°C . Comparar el crecimiento en ambos medios: la cantidad de colonias así como también su tamaño y apariencia deberán ser iguales. Si hay menos colonias en un medio o las colonias son más pequeñas, se deberá desechar el lote completo.
- D.** Registrar los resultados en un formulario de CC.
6. Verificar la potencia de los fármacos.
- Se deberá verificar la capacidad de cada lote de medio con fármaco para inhibir el crecimiento de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, control

pan-sensible en una concentración de cfu/mL 100 veces más alta que en la prueba para evaluar la capacidad para favorecer el crecimiento.

Nota: este control se deberá incluir cada vez que se utilice el medio para analizar las muestras de pacientes.

- A. Preparación de la suspensión *STOCK2* H37Rv.
 - 1. Utilizar la suspensión restante una vez completado el paso 5 del protocolo *STOCK1* para preparar la solución *Stock2*.
 - 2. Preparar el 7H9 en glicerol al mezclar 20 mL de glicerol en 80 mL de caldo 7H9.
 - 3. Preparar una dilución de 1:10 de la suspensión H37Rv (del paso 1) al transferir 5 mL a un pequeño matraz con 45 mL de caldo 7H9 con glicerol (del paso 2). La dilución final de glicerol será 18% v/v.
 - 4. Etiquetar los crioviales: *STOCK2*.
 - 5. Alicuotar la suspensión resultante de H37Rv en los crioviales (1 mL cada uno) y congelar a -70°C .
- B. Antes de utilizar, descongelar un criovial de *STOCK2* a temperatura ambiente.
- C. Inocular 0,2 mL de la suspensión en los tubos con antibióticos de un nuevo lote (2-3 tubos por fármaco).
- D. Incubar 14 días a 37°C . Examinar cuidadosamente cada tubo para asegurarse de que no se observan colonias o microcolonias. Si hubiera alguna colonia detectable, independientemente del tamaño, entonces todos los resultados de las pruebas realizadas de ese día se deberán considerar inválidos.
- E. Si no se detecta un crecimiento visible después de 14 días, incubar por siete días adicionales y repetir la lectura. Para la interpretación proceda de manera similar a la lectura hecha a los 14 días. El propósito de la lectura a los 14 días es detectar, lo antes posible, problemas potenciales con los fármacos.
- F. Registrar los resultados en un formulario de CC.

Anexo M

Control de calidad para el método Griess

I. Control de calidad interno (CCI)

1. Calidad de la muestra para GRIESS

La calidad de la muestra que recibe el laboratorio es muy importante para un resultado confiable. La calidad de la muestra deberá monitorearse y analizar de manera rutinaria, con la finalidad de identificar deficiencias sistemáticas en la obtención o manipulación de la muestra de esputo.

Indicador 1: las muestras de esputo se deberán transportar al laboratorio de referencia de manera apropiada de acuerdo con las recomendaciones de los manuales técnicos.

Estándar: 100% de muestras deben estar adecuadamente transportadas.

Monitoreo: el laboratorio ejecutor deberán evaluar todos los envíos de muestras, se registrarán el correcto transporte, presencia o ausencia de derrames y se informará al centro de salud remitente si el empaque es incorrecto y si existe derrames para un nuevo envío (porcentaje de envíos de manera inapropiada, con derrames) deberá hacerse cada seis meses.

Indicador 2: todas las muestras de esputo deberán estar rotuladas correctamente y deberán estar acompañadas de la solicitud de investigación de bacteriológica en tuberculosis correctamente llenadas.

Estándar: 100% de envases deberán estar etiquetadas con el nombre del paciente. Más de 97% de las fichas de solicitud de investigación bacteriológicas. deberán contener toda la información requerida.

Monitoreo: el laboratorio ejecutor deberá evaluar las muestras y fichas al momento de su recepción. La información se analizará mensualmente.

Indicador 3: todas las muestras de esputo deben llegar al laboratorio de referencia dentro de las 72 horas, después de su recolección.

Estándar: más del 90% de las muestras de esputo deben llegar dentro de las 72 horas a partir de su recolección.

Monitoreo: se registrará la fecha de recolección del esputo, la fecha llegada al laboratorio y la fecha de obtención del resultado. Analizar la información mensualmente.

Indicador 4: las muestras de esputo deben ser de calidad adecuada.

Estándar: cantidad suficiente (2 a 3 mL), temperatura adecuada (refrigeración), sin contaminación (ausencia de contaminación por hongos).

Monitoreo: trimestralmente por el laboratorio de referencia que procesa el método Griess.

2. Descontaminación

La descontaminación es la eliminación de la flora acompañante en la muestra de esputo sin destruir de manera excesiva las micobacterias, y evitar los resultados falsos negativos. La proporción de contaminación menor del 2% puede implicar una excesiva descontaminación, proporciones mayores a 5% sugiere una descontaminación insuficiente ocasionaría la repetición de los cultivos y trabajo en exceso.

Indicador 1: la contaminación de los cultivos debe estar en un rango aceptable.

Estándar: el rango estándar de contaminación es de 3 a 5%.

Monitoreo: el laboratorio que desarrolla el método Griess debe evaluar la contaminación mensualmente.

3. El Cultivo

Indicador 1: una muestra de esputo frotis positivo debe tener alta correlación con la positividad del cultivo.

Estándar: muestras frotis positivo de pacientes que no reciben tratamiento deben resultar 100% de cultivos positivos.

Monitoreo: el laboratorio que desarrolla el método Griess debe evaluar la positividad de las muestras por cultivo.

Acción correctiva

- Verificar la baciloscopía en caso de discrepancias con los resultados de las baciloscopías reportadas en la solicitud de inves-

tigación bacteriológica en tuberculosis. Si la baciloscopía de repetición es negativa, es posible que exista problema con la muestra enviada o con los resultados que informó el centro de salud remitente. Es posible investigar la salud del paciente.

- Verificar la calidad del medio de cultivo.
- Verificar los procedimientos y el índice de contaminación para asegurar que el procedimiento de descontaminación no sea excesivamente severo.
- Verificar el proceso de centrifugación para asegurar que se ha utilizado 3000 g

II. Evaluación externa de la calidad (EEC)

La evaluación externa de la calidad estará a cargo del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud, mediante dos sistemas de control de calidad externo:

- Test de proficiencia a través de envío de un panel de cepas codificadas, una vez al año.
- Los laboratorios que desarrollan la prueba Griess, enviarán las cepas monorresistentes a INH o RIF y resistentes a INH+RIF al INS, cronológicamente para la verificación de los resultados. El INS realizará el monitoreo trimestralmente.
- El INS programará para cada laboratorio implementado realizar el 30% de los cultivos sensibles en un período determinado.

Anexo N

Indicaciones para la baciloscopía, en los centros de salud y en los laboratorios de la DISA.

- A. El método estándar para la baciloscopía con el método directo de Griess es:
1. Procesar el esputo por el método directo de Griess de acuerdo al método de Kent y Kubica. Después del procesamiento y la centrifugación, el sedimento se resuspende con *buffer* fosfato hasta un volumen total de 2 mL. Una gota para realizar la baciloscopía

indirecta. El procedimiento de Griess con una carga bacteriana igual o mayor a una cruz (Bk 1+).

Si el frotis ya fue realizado directamente del esputo en el laboratorio del centro de salud, se deberá repetir usando el método de baciloscopía indirecta en el laboratorio de la DISA (es decir, a partir del sedimento procesado y resuspendido).

- B. El protocolo para los laboratorios de centros de salud deberá ser como sigue:
- Los frotis se procesan mediante baciloscopía directa (es decir, directamente de las muestras de esputo).
 - Todas las muestras de esputo con BAAR positivos deberán ser enviadas al laboratorio de la DISA y seguir los procedimientos del método Griess, cultivo y prueba de sensibilidad de acuerdo al algoritmo establecido.
- C. El protocolo para los laboratorios de la DISA, que reciben muestras de esputo de los centros de salud, deberá ser como sigue:
1. Cuando los laboratorios de la DISA reciben el esputo (positivo en caso haya presencia de BAAR), deben proceder con la baciloscopía indirecta, tal como se describe en el algoritmo. Luego, todos los frotis con una carga de BAAR igual o mayor a una cruz (Bk1+) que cumplan con otros requerimientos de la muestra) deben ser sometidos a la prueba de sensibilidad mediante el método directo de Griess.

Este documento se terminó de imprimir
en los talleres gráficos de AGL gráfica color SRL
Pasaje Monte Eucalipto 140-Santiago de Surco
Telf.: (511) 242-7199
2012

ISBN: 978-612-310-001-8



Instituto Nacional de Salud
Jirón Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú
Teléfonos: (0511) 617-6200 Fax: (0511) 617-6244
Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe
Página web: www.ins.gob.pe

