



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

CONSIDERACIONES TÉCNICAS PARA EL USO DEL BACTEC MGIT 960  
EN LA DETECCIÓN DE PIRAZINAMIDA PARA *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* EN UN LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN

TECHNICAL CONSIDERATIONS FOR THE USE OF THE BACTEC MGIT  
960 IN THE DETECTION OF PYRAZINAMIDE FOR *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* IN A RESEARCH LABORATORY

TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN  
LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA  
PATOLÓGICA

AUTORES

LIZETTE CRISTINA VILLANUEVA MORALES  
PATRICIA MILAGROS FUENTES BONILLA

ASESOR

JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

CO-ASESOR

ESTHER ROSAURA BELLIDO HUASHUAYO

LIMA – PERÚ

2024



**ASESORES DE TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL**

**ASESOR**

JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0001-9134-7322

**CO-ASESOR**

ESTHER ROSAURA BELLIDO HUASHUAYO

Departamento Académico de Tecnología Médica

ORCID: 0009-0007-9035-8143

Fecha de Sustentación: 29 de junio de 2024

Calificación: Aprobado

## **DEDICATORIA**

El presente Trabajo de Suficiencia Profesional es dedicado a nuestros familiares por su esfuerzo y apoyo en perseguir nuestros sueños. A nosotras mismas por luchar y no rendirnos en el camino de nuestro desarrollo profesional.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos al Laboratorio de investigación en donde se desarrolló el presente trabajo, a nuestros docentes y asesores cuyas enseñanzas y experiencias profesionales nos ayudaron con el desarrollo del presente trabajo.

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS**

El presente trabajo de suficiencia profesional cumple con los lineamientos éticos en investigación. Se declara que no presenta conflictos de interés.

## RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

### CONSIDERACIONES TÉCNICAS PARA EL USO DEL BACTEC MGIT 960 EN LA DETECCIÓN DE PIRAZINAMIDA PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN UN LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN

#### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>8%</b>	<b>7%</b>	<b>1%</b>	<b>1%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

#### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>2</b>	<b>www.researchgate.net</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>docplayer.es</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<b>documentop.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>search.bvsalud.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>doku.pub</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>revistabiomedica.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. DEFINICIONES TEÓRICAS	2
IV. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA	4
V. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL	7
VI. COMPETENCIAS PROFESIONALES UTILIZADAS	13
VII. APORTES A LA CARRERA (COMPETENCIAS ADQUIRIDAS EN LA PRÁCTICA PROFESIONAL NUEVAS O COMPLEMENTARIAS)	14
VIII. CONCLUSIÓN	15
IX. REFERENCIAS	16
X. ANEXOS	23

## 1. RESUMEN

**Introducción:** La tuberculosis, un problema de salud pública global con aumento de casos multidrogo resistentes en nuestro país, es una preocupación actual. Esto nos lleva a evaluar la Pirazinamida, un antibiótico con eficacia en bacilos latente de *Mycobacterium tuberculosis*. BACTEC MGIT 960 es un método para determinar la susceptibilidad a la Pirazinamida, aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) por su confiabilidad y rapidez en realizar el diagnóstico de resistencia, si se tiene en cuenta las consideraciones técnicas adecuadas.

**Objetivo:** Detallar las consideraciones técnicas necesarias para llevar a cabo eficazmente la prueba de susceptibilidad a la Pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el sistema BACTEC MGIT 960.

**Descripción del trabajo:** Se identificaron las consideraciones técnicas para el método BACTEC MGIT 960, respaldado por evidencia científica de los últimos años. Según lo recopilado, se realizaron ajustes relacionados con la preparación del inóculo en el protocolo que existe para susceptibilidad a la Pirazinamida en BACTEC MGIT 960.

**Resultado:** Se encontró que las consideraciones técnicas permitieron mejorar los resultados obtenidos por el método BACTEC MGIT 960 para Pirazinamida.

**Conclusión:** El ejecutar correctamente las consideraciones técnicas del BACTEC MGIT 960 para susceptibilidad a la Pirazinamida, garantiza la confiabilidad de la prueba.

**Palabras clave:** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Pirazinamida y BACTEC MGIT 960.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Tuberculosis, a global public health problem with an increase in multidrug-resistant cases in our country, is a current concern. This leads us to evaluate Pyrazinamide, an antibiotic with efficacy on latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. BACTEC MGIT 960 is a method to determine susceptibility to Pyrazinamide, approved by the Food and Drug Administration (FDA) for its reliability and speed in making the diagnosis of resistance, if the appropriate technical considerations are taken into account.

**Objective:** Detail the technical considerations necessary to effectively carry out the Pyrazinamide susceptibility test in *Mycobacterium tuberculosis* using the BACTEC MGIT 960 system.

**Description of the work:** Technical considerations for the BACTEC MGIT 960 method were identified, supported by scientific evidence from recent years. According to what was collected, adjustments related to the preparation of the inoculum were made in the protocol that exists for susceptibility to Pyrazinamide in BACTEC MGIT 960.

**Result:** It was found that technical considerations allowed improving the results obtained by the BACTEC MGIT 960 method for Pyrazinamide.

**Conclusion:** Correctly executing the technical considerations for BACTEC MGIT 960 for Pyrazinamide Susceptibility guarantees the reliability of the test.

**Keywords :** Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, Pyrazinamide and BACTEC MGIT 960.

## I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa transmisible que se puede prevenir; sin embargo, continúa siendo una problemática a nivel mundial que reporta miles de casos nuevos anualmente convirtiendo a nuestro país en el segundo de la lista según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1). En el Perú, entre los años 2018-2022 el número de cepas resistentes a rifampicina o multidrogoresistente ha sido de manera creciente cada año, variando en porcentajes según diferentes grupos poblacionales (2), lo cual genera una gran preocupación en el Ministerio de Salud debido a que la tasa de mortalidad sigue persistiendo (3).

Cuatro drogas forman parte del primer esquema de tratamiento de la tuberculosis, estas son: Isoniazida, Rifampicina, Etambutol y Pirazinamida (4). Este esquema hace que el tratamiento sea complejo cuando se presentan casos de multidrogo resistentes (MDR) o extremadamente resistentes (XDR), los cuales son resistentes a drogas de segunda línea y fluoroquinolonas. Esta resistencia está asociada a mutaciones en sus blancos de acción de cada una de estas drogas y es un desafío lograr un tratamiento eficaz contra la tuberculosis, por lo que podemos decir que la efectividad del tratamiento va depender del desarrollo y aplicación de pruebas de diagnóstico genotípicas y fenotípicas (5).

La Pirazinamida (PZA) es una prodroga, cuya forma activa es el ácido pirazinoico dada mediante la enzima pirazinamidasa (PZasa) codificada por el gen *pncA*. La importancia de esta droga radica especialmente en su eficacia en el tratamiento contra la tuberculosis sensible y resistente acortando el tiempo de 9 meses a 6 meses, debido a la acción que realiza sobre los bacilos latentes (6, 7). Existen varias pruebas de susceptibilidad para esta droga, uno de estos métodos es el BACTEC MGIT 960 (8), el cual está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA); sin embargo, algunos laboratorios no realizan este método debido a las consideraciones técnicas asociadas con el ensayo (9, 10).

En el Perú, muy pocos laboratorios utilizan este método de susceptibilidad a drogas antituberculosas, ya sea en el área asistencial como en el área de investigación. Al tener una demanda de casos de tuberculosis tan alta, el programa de control de

tuberculosis no ha tenido éxito, esto debido a diversos factores, siendo uno de ellos el retraso que existe en realizar el diagnóstico de resistencia (11).

Por lo expuesto, con la finalidad de optimizar el protocolo de prueba de susceptibilidad mediante el uso del BACTEC MGIT 960, en un laboratorio de investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, y al realizar una detección temprana de resistencia, se pretende responder a la interrogante: ¿cuáles son las consideraciones técnicas que se debe tener en el método BACTEC MGIT 960 Pirazinamida para *Mycobacterium tuberculosis*?

## **II. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Detallar las consideraciones técnicas necesarias para llevar a cabo eficazmente la prueba de susceptibilidad de la Pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis* utilizando el sistema BACTEC MGIT 960.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Identificar las dificultades encontradas durante la ejecución del método de BACTEC MGIT 960 para la detección de Pirazinamida en *Mycobacterium tuberculosis*.

Mejorar el Protocolo establecido para el método de BACTEC MGIT 960 en la detección de Pirazinamida para *Mycobacterium tuberculosis*.

## **III. DEFINICIONES TEÓRICAS**

### **Tuberculosis**

Enfermedad infectocontagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que generalmente afecta a los pulmones, pero no excluye que se presenten casos extrapulmonares (riñones, columna vertebral, cerebro). El contagio es por vía aérea a través de gotas que contienen a la bacteria (12). No todas las personas infectadas desarrollan la enfermedad, por lo que se le conoce de dos formas: infección latente (forma inactiva) y la enfermedad propiamente dicha (forma activa) (13). Los

síntomas más frecuentes son: tos, fiebre, debilidad, pérdida de peso, dolor torácico y sudoración nocturna.

### ***Mycobacterium tuberculosis***

Es el agente causal de la enfermedad de Koch o Tuberculosis. Son bacilos aeróbicos, curvados y de crecimiento lento. Por la estructura de su pared celular que es rica en lípidos, son consideradas bacilos alcohol ácido- resistentes (BAAR), porque son resistentes a la decoloración con alcohol ácido y son consideradas GRAM positivas (14). Esta micobacteria pertenece al Complejo *M. Tuberculosis* que está conformada por otras micobacterias como: *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis* y *M. microti*; siendo *M. africanum* y *M. tuberculosis* los más patógenos para el hombre (15).

### **Multidrogo Resistente**

Definición para las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que son resistentes a Rifampicina o a la combinación de Isoniacida y Rifampicina (16,17). Estas drogas corresponden al primer esquema de tratamiento para la tuberculosis.

### **Pirazinamida**

Es una prodroga, cuyo metabolito activo es el ácido pirazinoico. Esta droga es parte del primer esquema de tratamiento contra la Tuberculosis, y cumple un rol importante, ya que es efectivo para las formas latentes del bacilo, acortando el tratamiento de 9 meses a 6 meses (18,19). En la actualidad no se sabe con certeza el blanco de acción, pero se postula que actúa a nivel de las bombas de eflujo, disrumpiendo la membrana y acidificando el medio interno de la bacteria (18).

### **Medios de cultivos para micobacterias**

Existen varios medios de cultivo para *Mycobacterium tuberculosis*, estos pueden ser medios de cultivo sólidos como Lowenstein Jensen, Middlebrook 7H10 y 7H11 (20), así como también medios de cultivo líquidos 7H9 y 7H12, los cuales son ingredientes de los métodos automatizados BACTEC 460 y BACTEC MGIT 960.

Cabe mencionar que, todos estos medios son usados tanto para diagnóstico clínico como para ensayos de susceptibilidad (21).

### **Cepa bacteriana**

Se denomina a un cultivo puro formado por bacterias provenientes de un solo aislado (22).

### **Inóculo bacteriano**

Es una porción de un cultivo bacteriano que es transferido a un medio de cultivo (22).

### **BACTEC MGIT 960 PZA**

Es un método automatizado no invasivo y no radiométrico que permite obtener resultados de pruebas de susceptibilidad a drogas antituberculosas en un menor tiempo y a gran escala. Se realiza en medio 7H9 o 7H12, y consiste en el uso de un tubo con una especie de silicona en el fondo que contiene un compuesto fluorescente que es sensible a la cantidad de oxígeno disuelto en el medio. Inicialmente la cantidad de oxígeno bloquea la fluoresceína, pero conforme la bacteria crece y consume el oxígeno, permiten que se emita la fluoresceína. Estos tubos son monitoreados con el instrumento BD BACTEC MGIT que va detectando la fluorescencia de manera cualitativa. Se analiza el tubo control versus el tubo con la droga, reportando los resultados como positivos o negativos en unidades de crecimiento (21).

## **IV. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA**

La tuberculosis, un problema de salud pública a nivel global, sigue incrementando anualmente en un 3.7% con un aumento anual del 10% de muertes (1). Tiene como tratamiento de primera línea a cuatro fármacos: Isoniazida, Rifampicina, Etambutol y Pirazinamida, pero en muchos casos se evidenció la propagación de tuberculosis multidrogo resistente (23, 24). Por lo que, evaluar la susceptibilidad a la

pirazinamida es importante por ser un antibiótico con acción frente a las formas activas y latentes del bacilo (25).

La evaluación de pirazinamida fue iniciada muchos años atrás por Zhang y diferentes colaboradores, ellos estudiaron los diferentes modelos de acción de este antibiótico (18, 23), descubriendo la necesidad de un pH ácido para evaluar su susceptibilidad y evitar una falsa resistencia. Esta resistencia se debe en un 70% de casos por la mutación del gen *pncA*, por lo que una forma de evaluar la susceptibilidad es mediante la aplicación de pruebas de diagnóstico genotípicas y fenotípicas.

Varios estudios se han realizado para la susceptibilidad a Pirazinamida, esto debido a los aumentos de casos de MDR y XDR. En un estudio de vigilancia realizado en países del sur asiático y Sudáfrica, se demostró que la resistencia a Pirazinamida es mayor (10.5 - 69 %) en casos de tratamiento previo (26). Adicionalmente, otro estudio que se realizó en un Centro de investigación en casos de tuberculosis con tratamiento previo, se determinó que la prevalencia de resistencia a la Pirazinamida fue del 31.8 % (27).

Se evidenció que para trabajar con tuberculosis y reconocer morfológicamente las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* es necesario capacitar al personal y que estos cuenten con las habilidades técnicas necesarias para las diferentes pruebas de susceptibilidad (28). Un método para evaluar la susceptibilidad a antibióticos, entre ellos la Pirazinamida, es el BACTEC MGIT 960, el cual es recomendado por la OMS (29). En un estudio sobre heterorresistencia a Pirazinamida se evaluó su susceptibilidad con el método de secuenciamiento Sanger gen y el ensayo enzimático Wayne, concluyendo la capacidad del BACTEC MGIT 960 y de Sanger en detectar resistencia en el punto crítico. Por el contrario, el método de Wayne demostró falsa susceptibilidad, en repetidas veces (30).

En una revisión sistemática se analizó los principales errores que se tienen al realizar la prueba de susceptibilidad a la Pirazinamida por BACTEC MGIT 960. Los estudios revisados encontraron varios casos de falsa resistencia por este método (42% - 54.2%); sin embargo, estos errores se debieron a una mala estandarización

del proceso de preparación del inóculo inicial (tamaño y densidad), alta concentración de pirazinamida (200 ug/mL) y homogenización del inóculo (31, 32). Además, algunos de los estudios comparan los resultados obtenidos por BACTEC MGIT 960 con pruebas de secuenciamiento de *pncA*, tomando en cuenta que no todas las mutaciones significan resistencia y no todas las cepas susceptibles carecen de mutaciones, se realizan baciloscopía BAAR para corroborar los resultados del cultivo BACTEC (33).

Una evaluación multicéntrica analiza la densidad celular del inóculo siguiendo tres protocolos diferentes de 21 días, con algunas pequeñas modificaciones según el laboratorio analista, utilizando el sistema BACTEC MGIT 960. Trabajaron con una concentración de 100 ug/mL de PZA y con diluciones diferentes en los tres métodos, pero manteniendo la proporción de 1:10 entre los tubos de control y PZA. De tal manera se pudo determinar que, el inóculo más diluido, es decir el de menor densidad, mejora la precisión de la prueba por BACTEC MGIT 960 reduciendo resultados de falsa resistencia de 55.2% a 16.0% (34).

En adición, la cantidad de inóculo que es inyectado en el tubo BACTEC que contiene el medio líquido, no debe ser ni tan grande ( $10^7$  cel./mL a  $10^8$  cel./mL) ni tan pequeño, debido a que tiene una relación directa con el pH del medio. Se requiere un ambiente ácido (pH 5.5 - 6.1) para la actividad de pirazinamida, por lo que, con un inóculo grande el pH aumenta, aumentando el MIC de PZA y con un inóculo demasiado pequeño es posible que los organismos no crezcan bien en el medio con pH bajo, pareciendo así una falsa susceptibilidad. El inóculo más comúnmente utilizado y recomendado por el CLSI es de  $10^6$  cel./mL (35).

En nuestro país, entidades como el Instituto Nacional de Salud, Hospital Nacional Hipólito Unanue y Hospital de Apoyo María Auxiliadora, cuentan con este equipo en áreas restringidas con personal especializado en áreas de alto riesgo de Laboratorio de Tuberculosis. Este es utilizado para la evaluación de drogas antituberculosas de primera línea, incluida la pirazinamida, a partir de muestras clínicas a excepción de sangre y orina (36). Sin embargo, la gran demanda de muestras para analizar y evaluar su susceptibilidad a los antibióticos se ve afectada por la falta de conocimiento e implementación de este método (37).

En síntesis, la evidencia científica respalda las consideraciones técnicas que se deben tener para el desarrollo del método BACTEC MGIT 960 para determinar la susceptibilidad a la Pirazinamida. La identificación de estas consideraciones técnicas y su buena ejecución pueden ayudar con la mejora de la sensibilidad y especificidad de este método automatizado. Estas consideraciones técnicas son:

- 1. Personal capacitado:** Se necesita contar con personal especializado en tuberculosis y con la capacitación necesaria en *Mycobacterium tuberculosis* para el desarrollo correcto de métodos de detección y susceptibilidad (28).
- 2. Preparación del inóculo:** Este aspecto abarca tamaño, homogeneización, densidad y volumen, los cuales son consideraciones que se deben tener para la preparación inicial del inóculo. El tamaño adecuado de una asada de cepa bacteriana del medio sólido se relaciona con una correcta homogeneización, para la obtención de una suspensión homogénea, sin grumos. Por otro lado, una menor densidad del inóculo mejora la precisión del método y el volumen que será inyectado en el tubo BACTEC, el cual debe seguirse según lo indicado en el CLSI (31, 32, 34, 35).
- 3. Confiabilidad de resultado:** Para confirmar el resultado obtenido, se sugiere comparar con otras pruebas como baciloscopía BAAR y pruebas genotípicas para el secuenciamiento del gen *pncA*. Además de realizar la prueba por duplicado (30, 33).

En base a todas estas evidencias nacionales e internacionales, recopiladas para un mejor desarrollo del método BACTEC MGIT 960 para determinar la susceptibilidad a la Pirazinamida, se dividieron las consideraciones técnicas en tres fases: fase pre-analítica, fase analítica y fase post-analítica.

## **V. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL**

### **a. LUGAR Y PERIODO DONDE SE DESARROLLÓ EL TSP**

El presente trabajo de suficiencia profesional se realizó en un laboratorio de investigación de Mycobacterias en la UPCH, entre el año 2022 y 2023.

## **b. DESCRIPCIÓN DE LA EXPERIENCIA PROFESIONAL Y ESTRATEGIAS APLICADAS**

En un laboratorio de investigación de Mycobacterias de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, como parte de un proyecto de investigación, se realizó el método BACTEC MGIT 960 para la prueba de susceptibilidad a la Pirazinamida. Se utilizaron cepas provenientes de pacientes con diagnóstico conocido y se siguió el protocolo del kit comercial. Para aumentar la sensibilidad de la prueba se realizaron modificaciones en el protocolo y los resultados obtenidos posteriormente fueron comparados por las pruebas de secuenciamiento para corroborar los resultados de la susceptibilidad fenotípica.

Para mejorar el protocolo del método BACTEC MGIT 960 se aplicaron estrategias en las diferentes fases:

### **FASE PRE – ANALÍTICA**

#### **Capacitación del personal**

Contar con un personal especializado y con las habilidades técnicas necesarias es importante para el reconocimiento morfológico de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* en medios sólidos y líquidos, además un personal capacitado puede llevar a cabo diferentes pruebas de susceptibilidad con las medidas de bioseguridad adecuadas (28).

#### **Tiempo de cultivo inicial**

El tiempo de días de cultivo de las cepas en medios sólidos, como 7H10 o 7H11 puede afectar los resultados de susceptibilidad, ya sean poco o muy desarrolladas. Por lo que se consideró un tiempo de cultivo entre 14 - 21 días (21).

### **FASE ANALÍTICA**

#### **Tamaño del inóculo**

El uso de un asa de siembra descartable de 10 ul, garantiza la uniformidad de la asada. Este paso inicial que es crítico para el ensayo debe realizarse bajo todos los criterios de bioseguridad (31).

### **Homogenización del inóculo**

La homogenización de la cepa se realizó añadiendo aproximadamente una asada del cultivo en un tubo de ensayo conteniendo agua destilada con *tween* y perlas de vidrio que, al ser agitadas en un vórtex en un tiempo de 3 minutos, se logra una suspensión homogénea, sin grumos de la cepa (32).

### **Medición de Turbidez**

La medición de la turbidez por la escala de McFarland al ser subjetiva, puede llevar a errores. Una escala de McFarland 0.5 es casi libre de turbidez por lo que, si esta se compara con las cepas homogenizadas en medio 7H9, cuya tonalidad es ligeramente amarilla, puede conducir a un error en el ajuste de la turbidez. Para ello las cepas fueron suspendidas en agua destilada para ser ajustadas a la escala de McFarland 0.5. Adicionalmente, un inóculo muy denso puede alterar los resultados a obtener, por lo que se realizó dilución 1:5 para mejorar la precisión del método (31, 34).

## **FASE POST – ANALÍTICA**

### **Corroboración de resultado**

En el laboratorio de investigación, para corroborar los resultados obtenidos del cultivo BACTEC MGIT 960, se realizaron los ensayos por duplicado, además de la baciloscopia BAAR y métodos de secuenciamiento para el gen *pnCA* (30, 33).

### **c. PRINCIPALES RETOS Y DESAFÍOS**

Ciertas consideraciones técnicas en el procedimiento del método BACTEC MGIT 960 para determinar la susceptibilidad de Pirazinamida son un gran desafío para el personal del laboratorio (9, 10), al ser una droga que es parte de los esquemas de tratamiento y actuar en las formas latentes de la enfermedad, y por las particularidades de la droga para su conversión a su metabolito activo (4, 7).

Las pequeñas modificaciones al protocolo del BACTEC MGIT 960 para la susceptibilidad a la Pirazinamida se llevaron a cabo para minimizar los posibles errores en los resultados de susceptibilidad.

### **Tiempo de cultivo de la cepa**

Los resultados de susceptibilidad no fueron reproducibles cuando se trabajaron con cepas poco o muy desarrolladas en el tiempo de cultivo sólido.

### **Tamaño del inóculo**

Una asada grande recolectada del cultivo agar 7H11 dificulta la homogenización de la cepa, así como el riesgo de generar gran cantidad de aerosoles, lo que puede llevar a correr el riesgo de que se pueda dar contaminación cruzada entre las muestras de trabajo, aun cuando esta se está trabajando en una cabina de Bioseguridad.

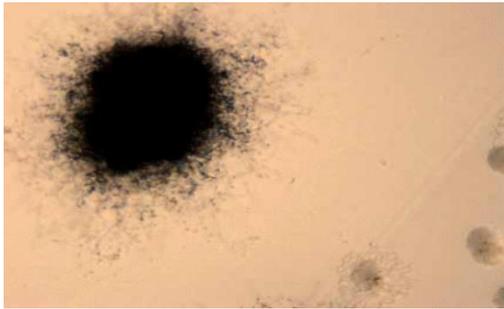
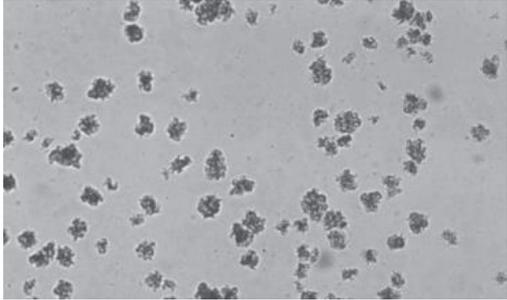
### **Mala homogenización**

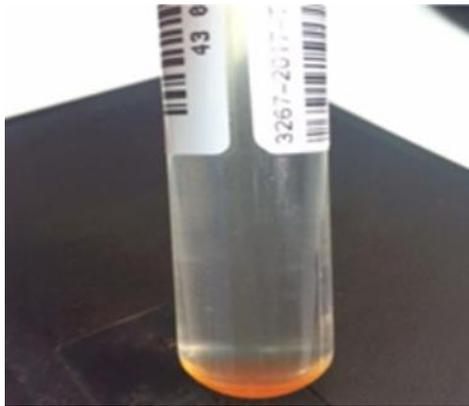
La homogenización del inóculo solo con medio 7H9 no es suficiente para disgregar la cepa, aun cuando se prolongue el tiempo de agitación. La apariencia de grumos que suele observarse es una característica del crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

## **d. PRINCIPALES HALLAZGOS**

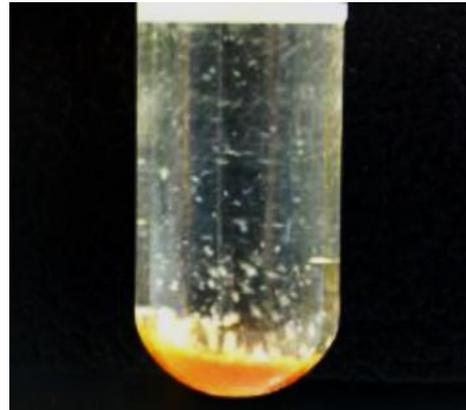
Durante el desarrollo del método BACTEC MGIT 960, aplicando las consideraciones técnicas mencionadas, los principales hallazgos fueron:

<b>Sin Consideraciones</b>	<b>Con Consideraciones</b>
Una placa contaminada de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en medio en sólido, genera resultados erróneos debido a una contaminación cruzada con otros agentes.	Se evidenció la necesidad de contar con personal capacitado en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> para garantizar la pureza de la cepa en medio sólido; así como, el reconocer cepas jóvenes o maduras de este agente.

 <p><b>Figura 1:</b> Cultivo agar 7H11 contaminado (38).</p>	 <p><b>Figura 2:</b> Microcolonias puras de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con 13 días de cultivo (39).</p>
<p>Una asada muy grande de cepa de <i>M. tuberculosis</i>, tomada del medio sólido, dificulta la obtención de una suspensión homogénea y a su vez, genera inóculos muy densos que conlleva a falsos resultados de susceptibilidad.</p>	<p>Es importante considerar un apropiado tamaño de la asada de la cepa para así poder obtener una suspensión homogénea mediante el uso de <i>tween</i> 80 y perlas de vidrio, los cuales a su vez, permiten una correcta estandarización con la escala de turbidez McFarland.</p>
<p>Un cultivo en placa con agar 7H11 contaminada o un mal procedimiento en la metodología de la prueba de susceptibilidad, que promueva la contaminación, conlleva a la contaminación de los tubos BACTEC MGIT 960, lo cual se evidencia mediante la turbidez del medio.</p>	<p>Un cultivo puro en agar 7H11, libre de contaminación y un correcto procedimiento en la metodología de la prueba, garantiza la fiabilidad de la prueba de susceptibilidad. El crecimiento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en un medio líquido es por la observación de agregados en un medio libre de turbidez.</p>



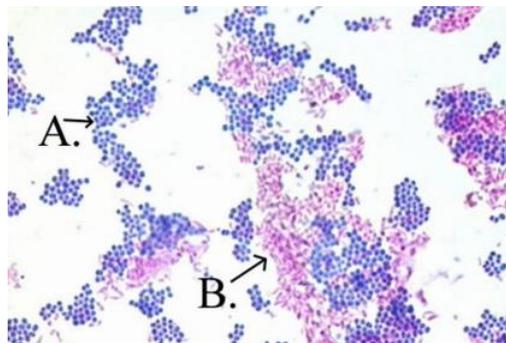
**Figura 5:** Tubo BACTEC-MGIT contaminado, nótese la ligera turbidez del medio (40).



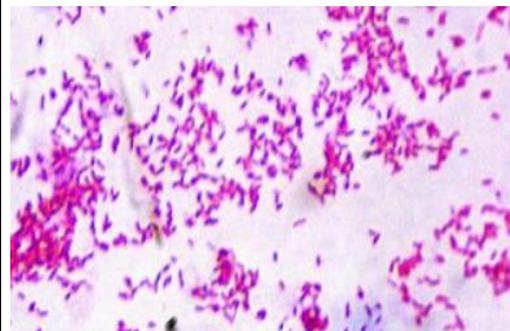
**Figura 6:** Tubo BACTEC- MGIT positivo a *M. tuberculosis* (40).

Teniendo en cuenta que el método se realizó con cepas ya identificadas como *M. tuberculosis*, al confirmar los resultados obtenidos por BACTEC MGIT 960, mediante una baciloscopía para BAAR, se evidencia contaminación.

En un tubo BACTEC MGIT 960 con *Mycobacterium tuberculosis* libre de contaminación, la baciloscopía mostrará únicamente BAAR teñidos de rojo- fucsia.



**Figura 7:** Bacilos teñidos de fucsia acompañado de cocos púrpuras (41).



**Figura 8:** Bacilos BAAR (42).

**Fuente:** Elaboración propia

## VI. COMPETENCIAS PROFESIONALES UTILIZADAS

El siguiente cuadro enlista los cursos con las competencias y justificación que se relacionan con el trabajo de suficiencia profesional.

Curso	Competencias y aptitudes adquiridas	Justificación
Microbiología / Bacteriología	Se estudia la estructura de bacterias, protistas y virus, su metabolismo, genética y su relación con la salud humana. Además, nos brinda conocimiento sobre los géneros bacterianos más importantes en la salud de nuestra población. Así como también, conocer métodos automatizados para la detección de estos agentes.	Este curso nos ayudó a tener conocimientos sobre todo lo que se debe realizar en el procedimiento para la identificación de las características fenotípicas del bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , que causa la enfermedad de la Tuberculosis.
Control de Calidad y Buenas Prácticas de Laboratorio / Gestión de Calidad en el Laboratorio Clínico	Nos brinda conocimientos sobre las buenas prácticas de laboratorio y los procesos de control de calidad llevado en los laboratorios de diagnóstico.	Para nuestro tema de experiencia profesional, este curso nos ayudó a identificar los requerimientos básicos de calidad para <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; así como, buscar qué pruebas analíticas están validadas y las condiciones necesarias para el manejo adecuado de las muestras.

<p>Metodología de la Investigación</p>	<p>Es una introducción a la investigación científica que nos ayuda a establecer un problema y plantear objetivos, respetando los aspectos éticos. Esto con la finalidad de comunicar en forma apropiada una propuesta de investigación.</p>	<p>Este curso nos brindó las competencias necesarias para poder entender e identificar un problema científico y, mediante la búsqueda de revisiones bibliográficas plantear nuestros objetivos de estudio.</p>
<p>Diseño, seguridad y automatización en equipos de laboratorio clínico</p>	<p>Nos brinda la capacidad de identificar los procesos generales, diseño, fundamentos, principios y procedimientos de los diferentes instrumentos y equipos que existen en un laboratorio.</p>	<p>Este curso nos ayudó a comprender el fundamento de un equipo automatizado de laboratorio, como el BACTEC.</p>

**Fuente:** Elaboración propia

## **VII. APORTES A LA CARRERA (COMPETENCIAS ADQUIRIDAS EN LA PRÁCTICA PROFESIONAL NUEVAS O COMPLEMENTARIAS)**

La carrera de Tecnología Médica en la especialidad de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica aporta grandes conocimientos y competencias para el desempeño profesional. Sin embargo, la mayoría de estas competencias son direccionadas a un aspecto asistencial, siendo nuestra casa de estudios una de las más destacadas por su excelencia en investigación. Por tal, se recomienda una actualización en el enfoque científico que nos brindan en los cursos de carrera.

Curso	Aporte
Microbiología / Bacteriología	Se recomienda implementar un módulo de actualización con respecto a las diferentes pruebas de laboratorio que surgen para la identificación de agentes patológicos, así como también sus pruebas de susceptibilidad, debido a que la resistencia a fármacos es un tema de mayor preocupación cada año (23, 26). Con la inclusión de esta competencia, el profesional de laboratorio tendrá la capacidad de reconocer y seleccionar la mejor opción para concluir alguna problemática en cuestión.
Metodología de la investigación	A pesar de los conocimientos brindados en este curso, se sugiere que se implementen más clases con puntos clave y métodos sobre estrategias de redacción como, por ejemplo, el Método de sándwich (pan, carne, pan) para así lograr el desarrollo de párrafos estructurados con la información necesaria. La búsqueda de revisiones sistemáticas nos ayuda con la recolección de datos sobre el tema que se desea investigar, por lo que el uso de un gestor de referencia fácil de utilizar, como Zotero, es de gran ayuda.

**Fuente:** Elaboración propia

## VIII. CONCLUSIÓN

La viabilidad, pureza y preparación del inóculo de la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* es crucial para obtener resultados fiables de susceptibilidad a la Pirazinamida, la corroboración de estos resultados mediante la baciloscopía por BAAR proporciona una validación adicional a la prueba.

En conclusión, las consideraciones técnicas que se deben tener en la preparación del inóculo, como el tamaño de la asada, homogenización y densidad del inóculo, junto a la capacitación del personal y la corroboración de los resultados, permiten a los laboratorios de investigación y diagnóstico poder realizar una prueba confiable de susceptibilidad BACTEC MGIT 960 para la Pirazinamida.

## IX. REFERENCIAS

1. Organización Panamericana de la Salud. Tuberculosis en las Américas. Informe regional 2021 [Internet]. 2022 [citado 27 de abril de 2024]. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/57084>
2. Renjifo P, Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades - MINSA. Boletín Epidemiológico del Perú - Situación epidemiológica de la tuberculosis en el Perú, 2018 – 2022 [Internet]. 2023 [citado 27 de abril de 2024]. Disponible en: [https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin\\_202320\\_28\\_163316.pdf](https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_202320_28_163316.pdf)
3. Rios J, Ministerio de Salud. Boletín de Tuberculosis [Internet]. 2023. Disponible en: <http://www.tuberculosis.minsa.gob.pe/portaldpctb/recursos/20230824131232.pdf>
4. Peloquin CA, Davies GR. The Treatment of Tuberculosis. Clin Pharmacol Ther [Internet]. diciembre de 2021;110(6):1455-66. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33837535/>
5. Mushtaq F, Raza SM, Ahmad A, Aslam H, Adeel A, Saleem S, et al. Antimicrobial drug resistant features of Mycobacterium tuberculosis associated with treatment failure. PLoS One [Internet]. 26 de octubre de 2023 [citado 8 de mayo de 2024];18(10):e0293194. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10602240/>
6. Ministerio de Sanidad Política Social e igualdad, PHARMA K. Pirazinamida- Ficha técnica [Internet]. 2022. Disponible en: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/43418/43418\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/43418/43418_ft.pdf)
7. Palmero DJ, Lagrutta L, Inwentarz SJ, Vescovo M, Aidar OJ, Montaner PJG. Tratamiento de la tuberculosis drogorresistente en adultos y niños. Revisión Narrativa. . 2022; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35037870/>

8. Campelo TA, Cardoso de Sousa PR, Nogueira L de L, Frota CC, Zuquim Antas PR. Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far? *Access Microbiol* [Internet]. 2 de agosto de 2021 [citado 1 de mayo de 2024];3(8):000245. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8479963/>
9. Nasiri MJ, Fardsanei F, Arshadi M, Deihim B, Khalili F, Dadashi M, et al. Performance of Wayne assay for detection of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis study. *New Microbes New Infect* [Internet]. 5 de mayo de 2021 [citado 1 de mayo de 2024];42:100886. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8184659/>
10. Mok S, Roycroft E, Flanagan PR, Montgomery L, Borroni E, Rogers TR, et al. Overcoming the Challenges of Pyrazinamide Susceptibility Testing in Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. [citado 1 de mayo de 2024];65(8):e02617-20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8284449/>
11. Manga S, Reich MR. Understanding Reasons for Lack of Effectiveness of National tb Program in Peru: Qualitative Analysis of Mdrtb Control. *Journal of Epidemiology and Public Health* [Internet]. 2024; Disponible en: <https://www.wecmelive.com/open-access/understanding-reasons-for-lack-of-effectiveness-of-national-tb-program-in-peru-qualitative-analysis-of-mdrtb-control.pdf>
12. World Health Organization. Tuberculosis (TB) [Internet]. 2023 [citado 1 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>
13. Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis (TB) in the United States [Internet]. 2023 [citado 1 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/tb/default.htm>

14. Suárez I, Fünfer SM, Kröger S, Rademacher J, Fätkenheuer G, Rybniker J. The Diagnosis and Treatment of Tuberculosis. *Dtsch Arztebl Int.* 25 de octubre de 2019;116(43):729-35.
15. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: Normas y Guía Técnica. Parte I Baciloscopia [Internet]. 2008. Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/782>
16. Dheda K, Mirzayev F, Cirillo DM, Udwadia Z, Dooley KE, Chang KC, et al. Multidrug-resistant tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 24 de marzo de 2024;10(1):22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38523140/>
17. Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis (TB) - Drug-Resistant TB [Internet]. 2022 [citado 1 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/tb/topic/drtb/default.htm>
18. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr* [Internet]. agosto de 2014;2(4):MGM2-0023-2013. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26104205/>
19. Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis (TB) - Treatment for TB Disease [Internet]. 2023 [citado 1 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/tb/topic/treatment/tbdisease.htm>
20. Heilig CM, Feng PJI, Joloba ML, Johnson JL, Morgan K, Gitta P, et al. How we determined the most reliable solid medium for studying treatment of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* [Internet]. mayo de 2014 [citado 28 de mayo de 2024];94(3):317-22. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4070601/>
21. Becton, Dickinson and Company. BACTEC™ MGIT™ 960 PZA Kit - For the Antimycobacterial Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=18343>

22. Ministerio de Salud del Perú - Instituto Nacional de Salud. Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión [Internet]. 2002. Disponible en: <https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
23. Gamboa N, Reyes D, Ángel L, Quiroz Y, González F. Actualización en el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos. *Med Int Mex* [Internet]. 2023;39(3). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2023/mim233h.pdf>
24. Terán RC. Resistencia a Medicamentos en *Mycobacterium tuberculosis*: Una revisión. *SITUA* [Internet]. 18 de diciembre de 2023 [citado 9 de mayo de 2024];26(1). Disponible en: <https://revistas.unsaac.edu.pe/index.php/SITUA/article/view/1000>
25. Lamont EA, Dillon NA, Baughn AD. The Bewildering Antitubercular Action of Pyrazinamide. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 20 de mayo de 2020;84(2):e00070-19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32132245/>
26. Zignol M, Dean AS, Alikhanova N, Andres S, Cabibbe AM, Cirillo DM, et al. Population-based resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide and fluoroquinolones: results from a multicountry surveillance project. *Lancet Infect Dis* [Internet]. octubre de 2016;16(10):1185-92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27397590/>
27. Balay G, Abdella K, Kebede W, Tadesse M, Bonsa Z, Mekonnen M, et al. Resistance to pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from previously treated tuberculosis cases in Southwestern Oromia, Ethiopia. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* [Internet]. febrero de 2024;34:100411. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38222863/>

28. Raftery P, Ködmön C, van der Werf MJ, Nikolayevskyy V. European Union training programme for tuberculosis laboratory experts: design, contribution and future direction. *BMC Health Serv Res* [Internet]. 11 de mayo de 2020 [citado 24 de mayo de 2024];20:413. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7212721/>
29. World Health Organization. Practical manual on tuberculosis laboratory strengthening, 2022 update [Internet]. 2023 [citado 13 de mayo de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240061507>
30. Werngren J, Mansjö M, Glader M, Hoffner S, Davies Forsman L. Detection of Pyrazinamide Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 17 de agosto de 2021;65(9):e0072021. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34181476/>
31. Mustazzolu A, Piersimoni C, Iacobino A, Giannoni F, Chirullo B, Fattorini L. Revisiting problems and solutions to decrease *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamide false resistance when using the Bactec MGIT 960 system. *Original articles and reviews* [Internet]. 2019;55(1):51-4. Disponible en: [https://www.iss.it/documents/20126/45616/ANN\\_19\\_01\\_09.pdf](https://www.iss.it/documents/20126/45616/ANN_19_01_09.pdf)
32. Wang Q, Boshoff HIM. Minimum Inhibiting Concentration Determination in Liquid Cultures and on Solid Medium. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2021 [citado 24 de mayo de 2024];2314:595-609. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10500673/>
33. Kant K, Baveja CP, Sarkar J, Juyal D. Microbiological evaluation of clinically suspected cases of tubercular lymphadenopathy by cytology, culture, and smear microscopy – A hospital-based study from Northern India. *J Family Med Prim Care* [Internet]. marzo de 2019 [citado 27 de mayo de 2024];8(3):828-33. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6482784/>
34. Morlock GP, Tyrrell FC, Baynham D, Escuyer VE, Green N, Kim Y, et al. Using Reduced Inoculum Densities of *Mycobacterium tuberculosis* in MGIT

- Pyrazinamide Susceptibility Testing to Prevent False-Resistant Results and Improve Accuracy: A Multicenter Evaluation. *Tuberc Res Treat* [Internet]. 2017 [citado 13 de mayo de 2024];2017:3748163. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5698819/>
35. Association of Public Health Laboratories. Issues in Mycobacterium tuberculosis Complex Drug Susceptibility Testing: Pyrazinamide. *INFECTIOUS DISEASES* [Internet]. 2022; Disponible en: <https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/ID-2022-MTBC-DST-Pyrazinamide.pdf>
36. Ministerio de Salud. Resolución Directoral [Internet]. 2018. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1259561/RD106-2018-CENARES-MINSA.pdf>
37. Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis. EE.TT. Insumos de laboratorio estandarizados para el diagnóstico especializado de TB - Eq. Bactec [Internet]. 2019. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/4073515/EE.TT.%20Insumos%20de%20laboratorio%20estandarizados%20para%20el%20diagn%C3%B3stico%20especializado%20de%20TB%20-%20Eq.%20Bactec.pdf.pdf>
38. Dorronsoro I, Torroba L. Microbiología de la tuberculosis. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* [Internet]. 2007 [citado 15 de junio de 2024];30:67-85. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1137-66272007000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1137-66272007000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
39. Marcondes AG, Shikama MDLM, Vasconcellos SA, Benites NR, Morais ZMD, Roxo E, et al. Comparação entre a técnica de cultivo em camada delgada de ágar Middlebrook 7H11 e meio de Stonebrink para isolamento de Mycobacterium Bovis em amostras de campo. *Braz J Vet Res Anim Sci* [Internet]. 1 de junio de 2006 [citado 4 de junio de 2024];43(3):362. Disponible en: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26484>

40. Scappaticcio A, Arias F, Figueroa J. Guía Técnica para Cultivo de Micobacterias en Medio Líquido [Internet]. 2018. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/GU%C3%8DA%20T%C3%89CNICA%20PARA%20CULTIVO%20DE%20MICOBACTERIAS%20EN%20MEDIO%20L%C3%8DQUIDO.pdf>
41. Aryal S. Acid fast lab report - Acid-Fast stain Results and observation: Record the staining results you - Studocu [Internet]. 2022 [citado 15 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.studocu.com/en-us/document/new-york-city-college-of-technology/microbiology/acid-fast-lab-report/70818342>
42. Miyo S. Práctica 2 Tinción de Ziehl Neelsen [Internet]. Miyo Spiral. 2013 [citado 17 de junio de 2024]. Disponible en: <https://miyospiral.blogspot.com/2013/07/practica-2-tincion-de-ziehl-neelsen.html>

## X. ANEXOS

### Anexo 1: Carta de autorización del laboratorio.



#### UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares

LABORATORIO DE BIOINFORMÁTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Lima, 15 de junio 2024

Bachiller

Patricia Milagros Fuentes Bonilla

Egresado de la Escuela de Tecnología Médica

Universidad Peruana Cayetano Heredia

Presente.-

**Autorización del trabajo de suficiencia profesional  
titulado “Consideraciones técnicas para el uso del  
BACTEC MGIT 960 en la detección de la resistencia a  
pirazinamida para *Mycobacterium tuberculosis* en un  
Laboratorio de Investigación”**

Estimado Mg. Carlos Huayanay

Por medio de la presente, tengo el agrado de dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y a la vez informar, como Jefe del Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular, que se ha autorizado la ejecución del trabajo de suficiencia profesional.

Sin otro particular me despido de usted.

Atentamente,



**Dra. Patricia Sheén Cortavarría**  
Jefe de Laboratorio de Bioinformática  
y Biología Molecular