

Diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar con el Ensayo de MODS

Procedimiento Normalizado de Operación para la preparación e inoculación de la muestra para la detección de TBC

Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

1. Versión PNO

1.1. Número de versión

Versión 1.0

1.2. Elaborado por

Dr. David Moore

Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas.

Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

1.3. Aprobado por

Maxine Caws

Oxford University Clinical Research Unit, Hospital for Tropical Diseases, Ho Chi Minh City,
Vietnam.

Candidata Msc. Luz Caviedes

Lic.T.M. Jorge Coronel

Tec. Pilar Navarro

Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas.

Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

1.4. Fecha de aprobación

25 de Noviembre del 2008

2. Alcances del PNO

Este PNO describe la preparación de las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) para su inoculación y cultivo en las placas de MODS para la detección de TBC.

3. Documentos Relacionados

Este PNO asume que el lector está familiarizado con la guía de usuario de MODS. Esta guía proporciona una descripción completa de la metodología empleada para la preparación de las placas de MODS en el cultivo y prueba de susceptibilidad directa a drogas a partir de muestras de esputo. Este documento también debe leerse conjuntamente con el documento "M Caws Vietnam MCA SOP", el cual detalla el procedimiento completo del cultivo en MODS en LCR (no solamente la preparación de la muestra), realizado en Vietnam.

4. Referencias

Caws M, Thi Minh Ha D, Torok E, Campbell J, Dang Anh Thu D, Thi Hong Chau T, van Vinh Chau N, Tran Chinh N, Farrar J. *Evaluation of the MODS culture technique for the diagnosis of tuberculous meningitis*. PLoS ONE 2007; 2 (11): e1173.

Moore DAJ, Evans CAW, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A, Sanchez E, Piñedo Y, Saravia JC, Salazar C, Oberhelman R, Hollm-Delgado M-G, LaChira D, Escombe AR, Friedland JS. *Microscopic observation drug susceptibility assay for the diagnosis of TB*. N Engl J Med 2006; 355 (15): 1539-1550.

5. Comentarios Generales

Este documento ha sido preparado sobre la base del PNO desarrollado por Maxine Caws en Vietnam. Su laboratorio es uno de los principales laboratorios de diagnóstico de meningitis tuberculosa en el mundo y sin duda, tiene mayor experiencia con MODS para este propósito.

Maxine comenta en su PNO de laboratorio "La prueba de susceptibilidad directa a drogas con MODS aun no está validado para muestras de LCR - el bajo número de colonias en los pozos libres de drogas excluye la lectura de los pozos que contienen drogas. Por esta razón, en Vietnam, lugar con la mayor experiencia cultivando LCR utilizando el método de MODS, este método es utilizado solo para la detección y no para pruebas de susceptibilidad directa a

drogas. A través de este enfoque los cultivos positivos, que por lo general aparecen dentro de las 2 semanas, pueden ser cosechados más rápidamente que los cultivos convencionales para realizar luego pruebas de susceptibilidad indirecta. Además en Vietnam, son utilizados placas de 48 pozos en lugar de placas de 24 pozos."

Inoculando la muestra concentrada de LCR en un solo pozo ofrece una mejor sensibilidad que dividir la muestra en varios pozos.

6. PNO

6.1 Consideraciones generales para las muestras.

1. Las muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) son tomadas de sitios normalmente estériles (el espacio meníngeo).
2. Obtener el mayor volumen de LCR y colectarlo en un tubo estéril.
3. No se requiere adicionar a la muestra anticoagulante.
4. La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio para su proceso.
5. La muestra puede ser preservada en refrigeración a 2-8°C de preferencia por no más de 12 horas.

6.2 Muestra requerida para la inoculación

1. Volúmenes de al menos 5ml son preferibles por su alta sensibilidad (>60%) en el diagnóstico microbiológico de meningitis tuberculosa.
2. Concentrar todo el volumen de la muestra por centrifugación.

6.3 Procedimiento

1. Colocar la muestra en un tubo de centrifuga de 15ml y concentrar por centrifugación a 3000g por 15 minutos.
2. Decantar cuidadosamente el sobrenadante y dejar aproximadamente 350µl del sedimento utilizando una pipeta Pasteur estéril.
3. Usando una pipeta estéril resuspender el sedimento y preparar un frotis adicionando 2 gotas (100µl) en una lamina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen.
4. La suspensión remanente de la muestra esta lista para dispensarse en la placa.

6.4 Preparación Final de la placa de MODS (Detección)

Utilizando una pipeta Pasteur 5 gotas (250µl) de la suspensión final de la muestra son removidas para ser inoculadas en un pozo de la placa de MODS que contiene 750µl del medio 7H9-OADC-PANTA.

6.5 Procedimiento si el LCR es sanguinolento

1. Si la muestra de LCR es muy sanguinolenta esto puede interferir con la lectura de las placas, los glóbulos rojos deben ser lisados antes de su inoculación en la placa de MODS.
2. Procedimiento de lisis:
 - Adicionar 1000µl de agua destilada estéril a la muestra.
 - Vortexear por 5 segundos y dejar en reposo por 10 minutos.
 - Centrifugar a 13200g por 2 minutos.
 - Remover y descartar 1000µl del sobrenadante.

6.6 Lectura de las Placas e interpretación

Un resultado positivo es definido como el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia ($\geq 2\text{ufc}$) en el pozo. Para mas detalles en los resultados y lecturas ver la guía de MODS para las muestras de esputo.



David Moore

Noviembre, 2008