

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

Aspirado Ganglionar

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

Candidata Msc. Luz Caviedes

Lic.T.M. Jorge Coronel Herrera

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 aspirado ganglionar para su inoculación y cultivo en las placas de MODS para la detección de TBC.

3. Documentos Relacionados

Este PNO asume que el lector esta 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 para el cultivo y prueba de susceptibilidad directa a drogas a partir de muestras de esputo.

4. Referencias

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 basado en nuestra experiencia trabajando en la detección de TBC en muestras de aspirado ganglionar. La carga bacilar en las muestras de aspirado ganglionar es usualmente baja y es por ello que nosotros aconsejamos realizar la prueba solo como ensayo de detección más no como prueba de susceptibilidad directa. A través de este enfoque los cultivos positivos, que por lo general aparecen dentro de las dos semanas, pueden ser cosechados mas rápidamente que los cultivos convencionales para realizar luego pruebas de susceptibilidad indirecta. En cambio si se sospecha de una alta carga bacilar es posible realizar la prueba de susceptibilidad directa.

6. PNO

6.1 Consideraciones generales para las muestras.

1. Las muestras de aspirado ganglionar son asépticamente colectadas por personal medico en envases estériles conteniendo 2-3ml de solución salina fisiológica estéril al 0.85%, sin preservantes.
2. La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio para su proceso.
3. La muestra puede ser preservada en refrigeración a 2-8°C de preferencia por no más de 24 horas.

6.2 Muestra requerida para el proceso.

Colectar un volumen mínimo de 2-3ml de muestra de aspirado ganglionar.

6.3 Procedimiento

Dividir el volumen de la muestra en tubos de centrifuga estériles.

- 1ml es usado para la inoculación directa.
- 2ml es usado para ser decontaminado usando el método NaOH-NALC como para las muestras de esputo.

6.3.1 Proceso Directo

1. Utilizando una pipeta Pasteur, resuspender 1ml del aspirado ganglionar con 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene 5.1ml 7H9-OADC-PANTA) en un tubo; mezclar bien.
2. Preparar un frotis adicionando 2 gotas (100µl) en una lámina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen.
3. Adicionar la suspensión de la muestra al tubo que contiene el remanente del medio 7H9-OADC-PANTA; mezclar bien.
4. Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa.

6.3.2 Proceso de decontaminación

1. Decontaminar 2ml de la muestra siguiendo el método de NaOH-NALC descrito para las muestras de esputo. Dar un tiempo máximo de 15 minutos de exposición con el NAOH-NALC.
2. Usando una pipeta Pasteur estéril resuspender el sedimento en un total de 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene 5.1ml 7H9-OADC-PANTA) en el tubo de centrifuga; mezclar bien.
3. Preparar un frotis adicionando 2 gotas (100µl) en una lámina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen.
4. Adicionar la suspensión de la muestra al tubo que contiene el remanente del medio 7H9-OADC-PANTA; mezclar bien.
5. Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa.

6.4 Preparación final de la placa de MODS (Detección)

1. Dispensar 1ml de la suspensión final de la muestra en cada uno de los 4 pozos de una única columna en la placa de 24 pozos.
2. Almacenar la suspensión de la muestra remanente (2.1 ó 1.1ml) en un tubo estéril de microcentrífuga de 2-8°C como backup.
3. Repetir el mismo procedimiento con las otras muestras hasta que todas las columnas de la placa estén llenas con excepción de la columna 3 (o hasta que todas las muestras hayan sido dispensadas).
4. Dispensar 1ml del medio 7H9-OADC-PANTA **sin muestra** en los 4 pozos de la columna 3 de cada placa de MODS (controles internos negativos).
5. Cerrar la placa con su tapa, colocarla en una bolsa de polietileno tipo ziploc y cerrarla. (La bolsa no se abrirá de ahora en adelante).
6. Incubar a 37°C (No es necesario el enriquecimiento con CO₂).

Nota

La muestra decontaminada y la muestra directa es inoculada en columnas separadas (4 pozos para cada muestra), y puede ser dispensado en la misma placa.

Para la prueba de susceptibilidad directa, los volúmenes de inoculación en cada pozo debe ser como lo indica la guía de MODS para las muestras de esputo (ver punto 7.5 de la guía de MODS para muestras de esputo).

6.5 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 uno o más pozos. Para mas detalles en los resultados y lecturas ver la guía de MODS para las muestras de esputo.



David Moore

Noviembre 2008