

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.

Biopsia de Tejidos

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 biopsias de tejidos 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

Tovar M, Siedner MJ, Gilman RH, Santillan C, Caviedes L, Valencia T, Jave O, Escombe AR, Moore DAJ, Evans CA. *Improved diagnosis of pleural tuberculosis using the microscopic observation drug susceptibility technique*. Clin Infect Dis 2008; 46: 909-12.

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

Se carece de información comparando MODS con otras metodologías de cultivo para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de biopsias con la excepción de las biopsias pleurales. La decontaminación de las muestras de biopsia tomadas de sitios estériles puede reducir la sensibilidad del cultivo de MODS sin afectar significativamente la frecuencia de contaminación en los cultivos y, por lo tanto, no es recomendado. Sin embargo este procedimiento esta descrito debajo en el caso de que el laboratorio desee realizar este procedimiento.

6. PNO

6.1 Consideraciones generales para las muestras.

1. Las muestras de biopsias de tejidos 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 mínimo de 5mm³ de muestra de biopsia.

6.3 Procedimiento

1. La muestra de tejido es homogenizada en 300-400µl de solución salina fisiológica con un homogenizador de vidrio estéril (tipo Potter-Elvehjem).
2. Un volumen de muestra de 4ml es requerido luego de homogenizar el tejido.
3. Separar la muestra en 2 tubos estériles de centrifuga:
 - 2 ml es usado para la inoculación directa.
 - 2 ml es usado para ser decontaminado usando el método de NaOH-NALC como para las muestras de esputo.

6.3.1 Proceso Directo

1. Utilizando una pipeta Pasteur, resuspender 2ml de la muestra homogenizada 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 homogenizada 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 con una pipeta Pasteur; 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)

Inocular una alícuota de la muestra homogenizada no decontaminada y la decontaminada como sigue:

1. Dispensar 1ml de la suspensión final de la muestra en cada uno de los 4 pozos en una sola columna de la placa de 24 pozos.
2. Almacenar una alícuota stock de la suspensión de la muestra remanente (1.1ml) en un tubo estéril de microcentrífuga a 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 por cada muestra), y pueden ser dispensados en la misma placa.

6.5 Lectura de las Placas e interpretación

Un resultado positivo es definido como el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia (≥ 2 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