

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

Heces

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 heces 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

Yajko D, Nassos P, Sanders C, Gonzales P, Reingold A, Horsburgh R, Hopewell P, Chin D and Hadley K. Comparison of four decontamination methods for recovery of *Mycobacterium avium* complex from Stool. J Clin Microbiol 1993; 31(2): 302-6.

Oberhelman R, Soto-Castellares G, Caviedes L, Castillo M, Kissinger P, Moore DAJ, Evans C. and Gilman RH. Improved recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from children using the microscopic observation drug susceptibility method. Pediatric 2006; 118: 100-106.

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, La Chira 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 heces. Las heces son consideradas como muestras alternativas que dan la oportunidad de diagnosticar TBC pulmonar en pacientes sin producción de esputo. La carga bacilar en las muestras de heces 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.

6. PNO

6.1 Consideraciones generales para las muestras.

1. Colectar la muestra de heces en un envase de boca ancha con tapa rosca.
2. La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio para su proceso.
3. La muestra puede ser conservada en refrigeración a 2-8°C de preferencia por no más de 12 horas; de lo contrario la viabilidad de las micobacterias podría verse afectadas por el alto sobrecrecimiento de la microflora fecal.

6.2 Muestra requerida para el proceso

Colectar un mínimo de 1 gramo de heces.

6.3 Procedimiento de decontaminación

1. Pesar 0.1g de la muestra de heces y colocarlo en un tubo de centrífuga de 15 ml conteniendo 6ml de agua destilada estéril.
2. Cerrar la tapa firmemente y mezclar en un agitador durante 30 segundos para disolver la muestra de heces.
3. Dejar reposar por 15 minutos para separar las partículas de heces no disueltas.
4. Usando una pipeta Pasteur, transferir 2ml del sobrenadante a otro tubo estéril de centrífuga de 15ml y proceder a la decontaminación de la suspensión de las heces según el método NALC-NaOH descrito para las muestras de esputo.
5. Después de obtener el sedimento, resuspender este en un total de 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene 5.1ml 7H9-OADC-PANTA) en el tubo de centrífuga con una pipeta Pasteur; mezclar bien.
6. Preparar un frotis adicionando 2 gotas (100µl) en una lámina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen.
7. Adicionar la suspensión de la muestra al tubo que contiene el remanente del medio 7H9-OADC-PANTA: mezclar bien.
8. Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa.

6.4 Preparación final de las placas de MODS (Detección)

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 un alícuota stock de la suspensión de la muestra remanente (1.1ml) en un tubo estéril de microcentrifuga 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).

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