

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 Pleural, Sinovial y Pericárdico

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

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 líquidas 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

El diagnóstico de tuberculosis pleural es realizado mejor con una combinación de pruebas de diagnóstico. El cultivo del líquido pleural puede ser útil, tal como la estimación de la concentración de adenosina deaminasa (ADA) y la citología del líquido pleural. Sin embargo, el cultivo del tejido pleural obtenido por biopsia combinado con el examen histológico proporciona el más sensible combinado enfoque. El frotis para el examen microscópico del líquido pleural rara vez es útil; el examen microscópico del frotis del material obtenido por biopsia es informativo ocasionalmente. La decontaminación de muestras de líquido pleural reduce la sensibilidad del cultivo con MODS sin afectar significativamente la tasa de contaminación de los cultivos es por ello que no es recomendado.

Hasta donde sabemos no existen datos publicados que comparen el desempeño del MODS con otras metodologías de diagnóstico para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en líquido pericárdico y líquido sinovial. La decontaminación de las muestras de estos fluidos no se considera necesaria antes del cultivo, pero cuando hay sospecha que la muestra no es estéril,

la muestra puede dividirse en dos volúmenes iguales, uno es usado para ser decontaminado y el otro para la inoculación directa.

6. PNO

6.1 Consideraciones generales para las muestras

1. Las muestras de fluidos son tomadas de una zona afectada y normalmente estéril.
2. Las muestras son colectadas en una variedad de recipientes estériles sin preservantes.
3. La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio para su proceso.
4. La muestra puede ser preservada en refrigeración a 2-8°C de preferencia por no mas de 24 horas.

6.2 Muestra requerida para el proceso

Un volumen de 5 ml de muestra es recomendable. Se requiere concentrar la muestra.

6.3 Procedimiento

6.3.1 Proceso Directo (Muestras estériles)

1. La muestra es concentrada por centrifugación a 3000g por 15 minutos.
2. Luego de la centrifugación el sobrenadante es decantado cuidadosamente y el sedimento es resuspendido en un volumen total de 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene 5.1ml de 7H9-OADC-PANTA) en el tubo de centrífuga 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.

Notas:

Si se sospecha que la muestra líquida está ligeramente contaminada y esta probablemente se contamine, esta debe ser procesada por inoculación directa en el medio 7H9-OADC con 2X de PANTA, sin embargo si la muestra esta completamente contaminada se procederá a decontaminar esta.

El medio 7H9-OADC-2X PANTA puede ser usado para disminuir la probabilidad de contaminación en muestras líquidas ligeramente contaminados sin embargo esto no es una total garantía de que el cultivo no se contamine.

PANTA 2X puede obtenerse adicionando 200µl de PANTA en vez de 100 µl.

6.3.2 Proceso de Decontaminación

1. La muestra es concentrada por centrifugación a 3000g por 15 minutos.
2. Luego de la centrifugación decantar cuidadosamente el sobrenadante y dejar aproximadamente un volumen de 2ml.
3. 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.
4. 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 centrífuga; mezclar bien.
5. Preparar un frotis adicionando 2 gotas (100µl) en una lámina portaobjetos para realizar una tinción Ziehl Neelsen.
6. Adicionar la suspensión de la muestra al tubo que contiene el remanente del medio 7H9-OADC-PANTA; mezclar bien.
7. 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 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

Si el proceso de la muestra es directa o por decontaminación, la muestra decontaminada y la muestra directa debe ser inoculada en columnas separadas (4 pozos para cada muestra) y puede ser dispensada 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