



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)



Lima, 2011

MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ

MINISTRO

Alberto Tejada Noriega

VICEMINISTRO

Enrique Jacoby Martínez

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

ALTA DIRECCIÓN

Jefe

Percy Minaya León

Subjefe

Nora Reyes Puma

ÓRGANOS DE LÍNEA

Centro Nacional de Alimentación y Nutrición

Director General
Wilfredo Salinas Castro

Centro Nacional de Control de Calidad

Director General
Ruben Tabuchi Matsumoto

Centro Nacional de Productos Biológicos

Director General
Alberto Valle Vera

Centro Nacional de Salud Intercultural

Director General
Oswaldo Salaverry García

Centro Nacional de Salud Ocupacional y Protección del Ambiente para la Salud

Directora General
Estela Ospina Salinas

Centro Nacional de Salud Pública

Director General
Pedro Valencia Vásquez

ÓRGANOS DE ASESORAMIENTO

Oficina General de Asesoría Técnica

Director General
José Cárdenas Cáceres

Oficina General de Asesoría Jurídica

Directora General
Kirla Echegaray Alfaro

Oficina General de Investigación y Transferencia Tecnológica

Director General
Manuel Espinoza Silva

ÓRGANOS DE APOYO

Oficina General de Administración

Director General
José Arróspide Aliaga

Oficina General de Información y Sistemas

Director General
Javier Vargas Herrera

COMITÉ EDITOR INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

PRESIDENTE

César Cabezas Sánchez

MIEMBROS

Rosario Belleza Zamora
Zuño Burstein Alva
Daniel Cárdenas Rojas
Flor Fuentes Paredes
Lucio Huamán Espino
Charles Huamani Saldaña
Oswaldo Salaverry García
Diana Vergara Núñez
Liliana Vigil Romero
Javier Vargas Herrera

Secretaría Técnica

Bertha Huarez Sosa

PROGRAMA DE APOYO A LA REFORMA EN EL SECTOR SALUD - PARSALUD II

Coordinadora General
Paulina Giusti Hundskopf

Coordinador Técnico
Walter Vigo Valdez

Coordinadora del Proyecto Octava
Ronda Fondo Mundial
Rosa Inés Béjar Cáceres

Especialista en Laboratorio
Jessica Alvarado Guerrero



PERÚ

Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud

SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS DE *Mycobacterium tuberculosis* MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)

ELABORADO POR:

Blgo. LUIS ASENCIOS SOLIS
Blga. MARGOTH ACURIO USCA
Blga. NEYDA QUISPE TORRES
Blga. LUCY VASQUEZ CAMPOS

LIMA, 2011

Asencios Solís, Luis ; Acurio Usca, Margoth ; Quispe Torres, Neyda y Vasquez Campos, Lucy
Susceptibilidad a drogas de Mycobacterium tuberculosis mediante observación microscópica (MODS) / Elaborado por Luis Asencios Solís, Margoth Acurio Usca, Neyda Quispe Torres y Lucy Vasquez Campos. -- Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2012.

41 p. : il., tab. 14.5 x 22.5 cm.

1. TUBERCULOSIS RESISTENTE A MÚLTIPLES MEDICAMENTOS 2. OBSERVACIÓN / métodos 3. ISONIAZIDA 4. RIFAMPIN 5. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS 6. PERÚ

- I. Asencios Solís, Luis
- II. Acurio Usca, Margoth
- III. Quispe Torres, Neyda
- IV. Vasquez Campos, Lucy
- V. Instituto Nacional de Salud (Perú)
- VI. Perú. Ministerio de Salud

ISBN: 978-612-310-002-5

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2012-01107

Tiraje: 500 ejemplares

1ra. edición

© Ministerio de Salud, 2012

Av. Salaverry cuadra 8 s/n, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono: (511) 431-0410

Telefax: 01 – 3156600 anexo 2669

Página web: www.minsa.gob.pe

© Instituto Nacional de Salud, 2012

Cápac Yupanqui 1400, Jesús María, Lima, Perú

Teléfono.: 617-6200

Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe

Página Web: www.ins.gob.pe

Norma Técnica aprobada con Resolución Jefatural N.º 388-2011-J-OPE/INS

Diseño y diagramación: Segundo Eliades Moreno Pacheco

Corrección de estilo: Lic. Daniel Cárdenas Rojas

La versión electrónica de este documento se encuentra disponible en forma gratuita en www.ins.gob.pe

Este Manual ha sido desarrollado en el marco del Proyecto "Haciendo la diferencia: consolidando una respuesta amplia e integral contra la Tuberculosis en el Perú" Octava Ronda Fondo Mundial - Componente Tuberculosis bajo los términos de donación (Acuerdo de Subvención PER-809-G07-T suscrito entre el Ministerio de Salud y el Fondo Mundial - Receptor Principal PARSALUD II) Primera Fase.

Se autoriza su reproducción total o parcial, siempre y cuando se cite la fuente.

ÍNDICE

1.	Introducción	7
2.	Objetivo	8
3.	Campo de aplicación	8
4.	Definiciones y SIGLAS	8
5.	Fundamento del método	9
6.	Desarrollo del método de ensayo	9
	6.1 Condiciones previas	9
	6.2 Aspectos de bioseguridad	10
	6.3 Equipos, Insumos y materiales	10
	6.4 Preamálisis	12
	6.5 Procedimiento analítico	14
	Preparación final de la placa MODS	15
	Preparación Control positivo	15
	Lectura de placas	16
	6.6 Interpretación de resultados	17
	6.7 Informe de resultados	19
7.	Referencia Bibliográficas	20
8.	ANEXOS	
	Anexo A: Fujograma del método de análisis MODS	21
	Anexo B: Preparación de soluciones y medio de cultivo	25
	Anexo C: Preparación de antibióticos	29
	Anexo D: Escala estándar Mc Farland N.º 1	32
	Anexo E: Aseguramiento de la calidad	34
	Anexo F: Lectura e interpretación de los resultados	36
	Anexo G: Formulario de reporte de los resultados	38
	Anexo H: Ejemplo de registro del formulario de informe de resultados	39
	Anexo I: Crioconservación de los cultivos MODS	40

SECTOR SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



N° 388-2011-J-OPE/INS

RESOLUCIÓN JEFATURAL

Lima, 22 de diciembre de 2011

VISTO:

El Informe N° 199 – 2011 – DG – CNSP / INS, de fecha 22 de diciembre del 2011 del Centro Nacional de Salud Pública, que alcanza los Manuales de Procedimientos de Laboratorio; y

CONSIDERANDO:



Que, mediante Decreto Supremo N° 001-2003-SA, del 09 de enero del 2003, se aprueba el Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud, el cual señala entre sus objetivos principales, fortalecer la capacidad de diagnóstico en el ámbito nacional para la prevención y control de riesgos y daños asociados a las enfermedades transmisibles y no transmisibles, así como fortalecer el sistema de control de calidad de los alimentos, productos farmacéuticos y afines, como organismo de referencia nacional;



Que, de acuerdo a lo establecido en el artículo 36° del mismo texto normativo, el Centro Nacional de Salud Pública, es el órgano de línea del Instituto Nacional de Salud, encargado de normar, desarrollar, evaluar y difundir de manera integral la investigación en salud pública y las tecnologías apropiadas para la prevención y el control de las enfermedades transmisibles y no transmisibles, aportando criterios técnicos para la formulación de políticas que orienten la atención de salud en el área de su competencia;



Que, es necesario disponer de un método rápido para determinar el crecimiento y susceptibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a drogas como la isoniazida y la rifampicina en medio líquido, mediante la observación microscópica (MODS);

Que, la aplicación de dicho método facilitará el examen de un gran número de muestras de esputo a fin de seleccionar aquellos pacientes que pudieran estar potencialmente infectados con *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente (MDR) a los medicamentos, que no hayan iniciado tratamiento antituberculosis, pacientes nunca tratados, recaídas o abandonos recuperados con frotis positivo o negativo;

Que, es finalidad del presente Manual, estandarizar y dar a conocer en forma clara y definida el Método Susceptibilidad a Drogas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante Observación Microscópica (MODS); lo cual contribuirá a incrementar los niveles de seguridad diagnóstica de la Tuberculosis;



Que, mediante documento del Visto, el Centro Nacional de Salud Pública alcanza entre otros el Manual denominado "Método de Susceptibilidad a Drogas de *Mycobacterium tuberculosis* mediante Observación Microscópica (MODS) – V.01", para su aprobación por esta Jefatura Institucional;

Estando a lo propuesto por el Centro Nacional de Salud Pública, con el visto bueno de la Sub Jefatura, de la Oficina General de Asesoría Técnica y de la Oficina General de Asesoría Jurídica, y;



En uso de las atribuciones establecidas en el literal h) del artículo 12° y el artículo 36° del Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud aprobado por Decreto Supremo N° 001-2003-SA y en concordancia con lo dispuesto en la Directiva N° 001-INS/OGAT-V.02 "Directiva para la Elaboración, Revisión, Aprobación, Difusión, Actualización y Control de los Documentos Normativos del Instituto Nacional de Salud" aprobada mediante Resolución Jefatural N° 310-2010-J-OPE/INS;

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Aprobar el "Manual: Susceptibilidad a Drogas de Mycobacterium tuberculosis mediante Observación Microscópica (MODS) - V.01".

Artículo 2°.- Encargar a los Directores Generales, dentro del ámbito de su competencia, comunicar y difundir entre el personal a su cargo la presente Resolución.

Artículo 3°.- Encargar a la Oficina Ejecutiva de Organización, la difusión de la presente Resolución en el Portal de Normatividad Virtual.

Regístrese y comuníquese.



1. INTRODUCCIÓN

El método de MODS (*Microscopic Observation Drug Susceptibility assay*) se basa en un cultivo directo de muestras de esputo en medio líquido, que detecta *Mycobacterium tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a isoniácida y rifampicina directamente de dichas muestras. El método se basa en que el crecimiento bacteriano en forma de cordones se visualiza tempranamente en medio líquido a través de un microscopio de luz invertida.

Empleando un microscopio óptico de luz invertida y una placa de 24 pozos con muestras de esputo decontaminadas y resuspendidas en caldo Middlebrook 7H9 suplementado, se puede examinar y detectar las microcolonias en un promedio de siete días. Es un método mucho más rápido que la detección del crecimiento macroscópico de las colonias en medio sólido. La incorporación de isoniácida y rifampicina en el proceso permite analizar rápida y directamente la detección de TB MDR.

La simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad del medio y el crecimiento característico de *M. tuberculosis*, la evaluación de la susceptibilidad frente a drogas en un corto tiempo y el bajo costo de los reactivos, son sus mayores ventajas.

2. OBJETIVO

Disponer con de un método rápido para determinar el crecimiento y susceptibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a isoniacida y rifampicina en medio líquido por observación microscópica.

3. CAMPO DE APLICACIÓN

El método es aplicado en los laboratorios que han realizado la validación, como un método rápido de tamizaje para la detección de resistencia a isoniacida y rifampicina en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis pulmonar que aún no hayan iniciado tratamiento antituberculosis, pacientes nunca tratados, recaídas o abandonos recuperados con frotis positivo o negativo (número exacto de bacilos ácido alcohol resistente, +, ++ o +++).

4. DEFINICIONES Y SIGLAS

1.1. Tuberculosis Multidrogo Resistente:

Se refiere a la tuberculosis que presenta resistencia, simultánea a isoniacida y rifampicina, dos de los medicamentos más potentes en el tratamiento antituberculoso.

1.2. Siglas

AC: aseguramiento de la calidad

BAAR: bacilo alcohol ácido resistente.

CSB: cabina de seguridad biológica.

CC: control de calidad

DMSO: dimetil sulfoxido.

ESNP y CTB: Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis.

EEC: evaluación externa de calidad

EPP: equipos de protección personal

INH: isoniacida.

INS: Instituto Nacional de Salud.

MDR: Multidrogorresistente.

MODS: método de ensayo de cultivo y susceptibilidad a medicamentos antituberculosis mediante observación microscópica.

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*.

NaLC: N-acetil L-cisteína.

NaOH: hidróxido de sodio

OADC: suplemento de enriquecimiento (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa).

PSD: prueba de susceptibilidad a drogas.

PANTA: mezcla liofilizada de antibióticos (polimixina B, amfotericina B, ácido nalidixico, trimetoprim, azlocilina).

RIF: rifampicina.

TB: tuberculosis.

UFC: unidades formadoras de colonia

QP: químicamente puro

5 FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El método se basa en la observación de cordones característicos de *Mycobacterium tuberculosis* cuando crece en medio líquido, los cuales son visualizados tempranamente mediante el uso de un microscopio luz invertida.

El método, ha sido diseñado para la detección del crecimiento de MTB y la susceptibilidad a INH y RIF. La simplicidad de la técnica, la gran sensibilidad, la especificidad y el bajo costo son las mayores ventajas para su uso en países en vías de desarrollo.

6. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO

6.1. Condiciones previas

Se debe realizar el mantenimiento y la calibración de los equipos que se van utilizar tales como las micropipetas, la balanza analítica, los equipos controlados por temperatura (autoclave, centrífuga, incubadora), el potenciómetro y las cabinas de seguridad biológica clase II tipo A2, de acuerdo con el programa de mantenimiento preventivo establecido para

estos instrumentos y equipos. La balanza analítica debe ser calibrada antes de su uso y verificada usando pesas patrones certificadas.

6.2. Aspectos de bioseguridad

- Las prácticas microbiológicas estándar y las prácticas especiales deben ser siempre rigurosamente cumplidas.
- Todos los procedimientos que incluyen la manipulación de materiales infecciosos deben ser desarrollados dentro de la CSB.
- Las ventanas y las puertas del laboratorio han de permanecer siempre cerradas. La cabina debe de instalarse sobre una superficie sólida, nunca móvil.
- Los analistas deben usar equipos de protección personal (respiradores N95, mandiles, doble guante).
- Todos los procedimientos deben ser realizados cuidadosamente, con el objetivo de minimizar la producción de aerosoles.
- Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas diariamente, antes y después de terminar el trabajo, con alcohol al 70% o hipoclorito de sodio al 3%.
- En caso ocurra cualquier derrame de material peligroso sobre las superficies de trabajo, deben ser descontaminadas inmediatamente, de acuerdo con el procedimiento interno.
- Todos los residuos sólidos peligrosos, deben ser descontaminados antes de ser descartados.
- Los analistas deben recibir entrenamiento en bioseguridad sobre los riesgos potenciales asociados al trabajo desarrollado.

6.3. Equipos, insumos y materiales

- Autoclave.
- Balanza analítica (200 g \pm 1 g).
- Potenciómetro (medidor de pH).
- Calentador (*Hot-plate*) con barras de agitación magnéticas.
- Refrigeradora (4 °C).
- Congeladora (-20 °C o -70 °C).
- Microscopio de luz invertida (objetivos 4x y 10x).

- Micropipetas automáticas (1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L).
- Pipetas multicanal.
- Termómetros (control de temperatura).
- Vortex.
- Cabina de bioseguridad de clase II, tipo A2.
- Incubadora (37 °C)
- Centrifuga para trabajar a 3000 g x 15 min (puede ser refrigerada).

Materiales

- Tubos de vidrio estériles con tapa rosca de 16 x 100 mm.
- Tubos de centrifuga de polipropileno (base cónica) de 15 mL o 50 mL.
- Pipetas serológicas de 10 mL.
- Pipetas Pasteur.
- Puntas de 200 μ L, 1000 μ L con y sin filtro.
- Jeringas de tuberculina (en caso de no tener micropipetas).
- Microplacas de polipropileno de 24 pozos.
- Bolsas de polietileno tipo *ziplock*.
- Filtros de 0,2 μ m (para solventes acuosos).
- Filtros de 0,2 μ m (para solventes orgánicos).
- Tubos de microcentrifuga.
- Probeta graduada de 1000 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 2000 mL.
- Propipetas de 50 mL.
- Embudo de plástico de 15 cm de diámetro.
- Portatubos de 16 x 100 mm.
- Bolsas de bioseguridad.
- Crioviales de 2 mL.
- Plumón indeleble.
- Cinta indicadora para autoclave.
- Cinta indicadora para horno.
- Parafilm "M".

- Papel aluminio.
- Plásticos para pesar pequeñas cantidades o papel *glycine*.
- Espátulas pequeñas y delgadas de acero inoxidable (para pesar).

Insumos

- Caldo Middlebrook 7H9.
- Casitona (caseína pancreática digestiva).
- PANTA.
- OADC.
- ADC.
- RIF químicamente puro (Sigma Cat R-3501).
- INH químicamente puro (Sigma Cat. I-3377), DMSO.
- Hidróxido de sodio en lentejas (NaOH).
- Citrato de sodio tribásico, dihidratado.
- N-acetil L-cisteína (NaLC).
- Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na₂HPO₄).
- Fosfato de potasio monobásico en cristales (KH₂PO₄).
- Hipoclorito de sodio al 10%.
- Glicerol QP.
- Agua destilada estéril.
- 70% v/v etanol.

6.4 Preanálisis

- Retirar de la congeladora la solución *stock* de los antibióticos (8 mg/mL), dejar descongelar a temperatura ambiente.
- Preparación de la solución de trabajo de los antibióticos en la microplaca de 24 pozos
- Disponer de dos tubos con 10,8 mL de caldo 7H9, añadir a estos tubos 1,2 mL del suplemento OADC. (volumen total 12 mL)
- Dispensar 1 mL del caldo 7H9+OADC a los pozos C y D de la columna 1 de la microplaca.
- Empleando una micropipeta, retirar del pozo "C" 5 µL de medio y añadir 5 µL de la solución *stock* de INH. Mezclar bien (0,04 mg/mL = 40 µg/mL INH dilución 1) (ver anexo C).

- Empleando una micropipeta, retirar del pozo “D” correspondiente a rifampicina 12,5 µL de medio y luego añadir 12,5 µL de la solución *stock* de RIF; mezclar bien (0,1 mg/mL = 100 µg/mL RIF dilución 1) (ver Anexo C).

Preparación de la solución de trabajo.

- Dispensar 2 mL de caldo 7H9+OADC a los 4 pozos A, B, C, y D de la columna 2 de la microplaca.
- Empleando una micropipeta, retirar 200 µL del pozo “C” de la columna 2 y añadir 200 µL de la dilución 1 de INH al mismo pozo “C” de la microplaca; mezclar bien (4 µg/mL INH solución de trabajo). (ver Anexo C).
- Empleando una micropipeta, retirar 200 µL del pozo “D” de la columna 2 y añadir 200 µL de la dilución 1 de RIF al mismo pozo “D” de la microplaca; mezclar bien (10 µg/mL RIF solución de trabajo) (ver Anexo C).
- Empleando una micropipeta multicanal cargar 100 µL de la solución de trabajo de los pozos A, B, C, y D de la columna 2 y dispensar a los pozos A, B, C, y D de la columna 1 de una nueva microplaca destinada para las muestras.
- Repetir el mismo procedimiento hasta llenar todos los pozos de la microplaca. (incluyendo el control negativo de la columna 3).
- Separar en tubos de polipropileno de 15 o 50 mL, el volumen requerido de la solución *buffer* fosfato (pH 6,8, para enrasar de acuerdo a la capacidad del tubo utilizado en proceso de cada muestra de esputo. (ver Anexo B).
- Separar en tubos de polipropileno de 15 o 50 mL la solución *stock* de NaOH+citrato de sodio, para la descontaminación de las muestras de esputo) (ver Anexo B).
- Cada 2 mL de muestra de esputo requiere 2 mL de solución NaOH-citrato de sodio.
- Pesar la cantidad necesaria de NaLC que se va a añadir a la solución NaOH - citrato de sodio (ver Anexo B).
- Dispensar 4,5 mL de caldo 7H9 a los tubos 16 x 100 mm para las muestras de esputo y añadir 0,5 mL de OADC a cada tubo.
- Reconstituir PANTA y añadir 0,1mL a los tubos con 4,5 mL caldo 7H9+OADC para muestras y controles negativos (ver Anexo B).

- Separar dos tubos con 5 mL de 7H9+OADC para los controles positivos (estos no requieren PANTA).
- Muestras de esputo. La cantidad mínima de muestra requerida es 2 mL, con tiempo de recolección no mayor a 72 h, de pacientes con diagnóstico de TB pulmonar con baciloscopia positiva o negativa que aún no hayan iniciado tratamiento antituberculosis, pacientes nunca tratados, recaídas o abandonos recuperados.
- En caso de que la muestra no se procese el mismo día de la recolección, conservar la muestra en refrigeración de 4 a 8 °C. Enviar la muestra al laboratorio dentro de las 72 h (3 días) de haber sido recolectada.
- Todas las muestras de esputo deben ser recolectadas en recipientes plásticos de boca ancha y tapa rosca suministrados por la ESNP y CTB.
- Las muestras de esputo son recolectadas en establecimientos de salud bajo la supervisión de trabajadores de salud capacitados, quienes instruyen a los pacientes sobre la forma de obtener la muestra de esputo adecuada durante la consulta con el médico (primera muestra) y la segunda muestra tomada en la mañana siguiente después de la consulta. Las muestras deben ser transportadas siguiendo el protocolo establecido para la red de laboratorios.

6.5 Procedimiento analítico

- Procedimiento de descontaminación. Colocar 2 mL de esputo en un tubo de polipropileno de centrífuga de 15 mL o 50 mL.
- Añadir 2 mL de la solución NaOH-NaLC a una proporción (1:1).
- Asegurar bien la tapa y mezclar en el agitador por 20 s; mover el tubo por inversión para asegurar que la solución NaOH-NALC esté en contacto con todo el interior del tubo y con la tapa.
- Dejar reposar dentro de CSB por un mínimo de 15 min. Puede prolongarse por unos minutos más si la muestra es demasiado mucoide.
- Evitar el tiempo de sobreexposición, este no debe exceder los 20 min.
- Adicionar *buffer* fosfato (pH 6,8), para neutralizar la reacción alcalina y terminar con el proceso de descontaminación, mezclar bien invirtiendo el tubo por cuatro veces.

- Centrifugar a 3000 g por 15 min.
- Decantar cuidadosamente el sobrenadante, en un recipiente que contenga hipoclorito de sodio al 3% u otro desinfectante apropiado, mantener el sedimento de la muestra.
- Resuspender el sedimento de la muestra con 2 mL del medio 7H9-OADC-PANTA (5,1 mL).
- Homogenizar bien la suspensión evitando formar burbujas de aire.
- De esta suspensión de la muestra extraer 1 mL y hacer la siembra en dos tubos con medio L-J a razón de 0,2 mL por tubo y el resto en un criovial para conservarlo a 2-8 °C, como muestra de contingencia.
- Añadir el otro mililitro de la suspensión de la muestra al resto del medio 7H9-OADC-PANTA que está en el tubo; mezclar bien. Esta es la suspensión final de la muestra lista para dispensarse en la placa.
- Los tubos que contienen PANTA (7H9-OADC-PANTA) se emplean para las muestras y para los controles negativos.
- Se emplea 7H9-OADC sin PANTA para los controles positivos y para la preparación de la solución de INH y RIF.

6.5.1 Preparación final de la placa de MODS

- Dispensar 900 µL de la suspensión final de la muestra a cada uno de los cuatro pozos de la placa de 24 pozos. Excepto los pozos de la columna 3.
- Dispensar 900 µL del medio 7H9-OADC-PANTA sin muestra en los 4 pozos de la columna 3 de cada placa de MODS (controles internos negativos).
- Cerrar la placa, colocar en una bolsa de polietileno tipo *ziplock* y cerrar (la bolsa no se debe abrir de ahora en adelante).
- Incubar a 37 °C entre 5 a 21 días.

6.5.2 Preparación de las cepas control positivo - Control de Calidad Interno

- Cada vez que se procesan muestras, deben incluir dos cepas: control positivo, sensible y resistente INH y RIF.
- Mezclar 5 µL de cada suspensión de cepas (escala MacFarland N.º 1) con 5 mL del medio 7H9+OADC

- Empleando una pipeta multicanal, adicionar a los cuatro pozos, 100 µL de caldo 7H9+OADC y la solución de trabajo de antibióticos, igual que para las muestras.
- Alicuotar 900 µL de cada suspensión de cepas en los cuatro pozos de una columna en la placa separada para los controles positivos.
- Cerrar la placa y colocarla en la bolsa tipo ziplock.
- Incubar a 37 °C junto con las otras placas procesadas el mismo día.

6.5.3 Lectura de las placas

Un resultado positivo es definido como el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia (≥ 2 ufc) en cada uno de los pozos sin droga.

- Las placas son retiradas de la incubadora para su observación en el microscopio de luz invertida con las bolsas selladas, las cuales no deben abrirse.
- La lectura de las placas se inicia por los pocillos sin antibióticos en el día 5 de incubación.
- En sus inicios (entre los días 5 a 9) el crecimiento de MTB se observa como pequeñas "curvas", "comas" o "espirales".
- La formación de las colonias, por lo general, progresa a la formación de cordones y luego a un crecimiento irregular más enmarañado.
- Para las lecturas iniciales, examinar los pozos con el objetivo 10X (aumento total de 100X) en el microscopio de luz invertida, buscando el temprano crecimiento de las microcolonias. Para subsecuentes lecturas se utiliza el objetivo de 4X (40X total de aumento) para examinar todo el contenido de cada pocillo.
- No es muy común la contaminación con bacterias u hongos, pero usualmente aparece al día 5 un aspecto turbio y con crecimiento abundante. Si se produce la contaminación se deben volver a descontaminar y reprocesar las alícuotas de la muestra de contingencia o solicitar una nueva muestra al paciente.
- Los medios de cultivo no deben tener un aspecto turbio con el crecimiento de MTB.
- Los desechos acompañantes en la muestra pueden dificultar la detección temprana de micobacterias, pero con el tiempo, las

colonias más maduras pueden ser detectadas, sobre todo en la periferia de los pozos.

- El crecimiento en un solo pozo (con ausencia de contaminación), o menos de 2 UFC en cada pozo, debe considerarse como un resultado indeterminado y se debe solicitar inmediatamente la repetición del proceso de la muestra, y la búsqueda de evidencias de contaminación cruzada.
- El intervalo entre las lecturas puede ser flexible para adaptarse al trabajo y calendario del laboratorio. Lecturas más frecuentes conducen a obtener resultados más rápidos.

6.6 Interpretación de resultados

Observación de un pozo sin drogas	Interpretación de los hallazgos en los pozos
≥ 2 UFC	Positivo
No crecimiento (0 UFC)	Negativo
Crecimiento de 1 UFC	Indeterminado
Sobre crecimiento de bacterias /hongos	Contaminado

Interpretación

Combinando los hallazgos en ambos pozos (A y B)	Interpretación general de los cultivos
Ambos pozos positivos	Positivo
Ambos pozos negativos	Negativo
Uno o dos pozos indeterminados	Indeterminado
Un pozo positivo, y otro pozo negativo	Indeterminado
Un pozo positivo, y otro pozo indeterminado	Indeterminado
Uno o dos pozos contaminados	Contaminado

6.6.1 Determinación de la resistencia a medicamentos antituberculosis

- Los pozos con antibióticos solo deben examinarse cuando los pozos sin droga son positivos (≥ 2 UFC).
- La resistencia es definida como el crecimiento >2 UFC en los pozos con drogas (INH y RIF) el mismo día en que ambos pozos sin droga son positivos.
- Si hubiese crecimiento en un pozo que contiene droga, la muestra es resistente a esa droga (a la concentración específica); si no hay crecimiento significa que la muestra es sensible.
- Si existe crecimiento en ambos pozos conteniendo INH y RIF, la muestra es considerada MDR.
- Los pozos con droga **NO** deben volver a examinarse después del día que los pozos sin droga hayan sido identificados como positivos. Después de una incubación prolongada, el progreso en el crecimiento en los pozos con droga no es indicativo de resistencia.
- El crecimiento de MTB resistente en los pozos que contienen drogas, suele ser fácilmente identificable cuando los pozos sin droga son positivos.
- En pocas ocasiones es detectado una sola UFC en los pozos que contienen droga, si esto sucediera, la interpretación es indeterminada.

Observación de los pozos (C o D) que contienen drogas	Interpretación de los hallazgos en los pozos
No hay crecimiento (0 UFC)	Sensible
Crecimiento de ≥ 2 UFC	Resistente
Crecimiento de solo 1 UFC	Indeterminado
Crecimiento de bacterias /hongos	Contaminado

Interpretación

Combinando los hallazgos en ambos pozos (C y D)	Interpretación total de la susceptibilidad a los medicamentos antituberculosis
No hay crecimiento en ninguno de los pozos conteniendo medicamento antituberculosis	Sensible (no es MDR)
Crecimiento solo en el pozo con INH	Resistente a INH (no es MDR)
Crecimiento solo en el pozo con RIF	Resistente a RIF (no es MDR)
Crecimiento en ambos pozos con drogas	MDR
Crecimiento de 1 UFC en cualquier pozo con medicamento antituberculosis	Indeterminado para ese medicamento antituberculosis
Cualquiera de los pozos con medicamento antituberculosis contaminado	Indeterminado para ese medicamento antituberculosis

6.7 Informe de resultados

Determinación del crecimiento de micobacterias mediante cultivo

Positivo

Negativo

Indeterminado

Contaminado

Determinación de la resistencia a medicamentos antituberculosis

Resistente

Sensible

MDR

Contaminado

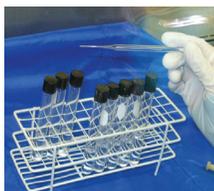
Indeterminado

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

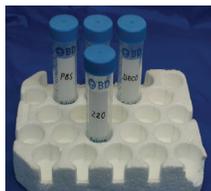
1. MODS. Guía del usuario. Microscopic observation drug susceptibility assay. 2008. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Laboratorio de Investigación y Desarrollo.
2. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte II Cultivo. 2008. OPS.
3. Caviedes L. 2000. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of MTB in sputum by microscopic observation of broth cultures. *J Clin Microbiol*.
4. Norma Técnica N° 10. Manual de Normas y Procedimientos de Bacteriología de la Tuberculosis, pp. 67, 1995 Lima-Perú.
5. www.cdc.gov/tb/publications/reportsarticles/mmwr/mmwr_mdrtb.htm

8. ANEXOS

ANEXO A FLUJOGRAMA DEL METODO DE ANALISIS MODS



1. Dispensar 4,5 mL de medio 7H9, a los tubos de trabajo.



5. Dispensar los volúmenes requeridos del stock de NaOH-citrato de Na, buffer fosfato y pesar el NALC cantidad necesaria.



2. Añadir 0,5 mL OADC al medio 7H9 (7H9-OADC).



6. Muestra de esputo con volumen no menor a 2 mL.



3. Reconstituir el PANTA, agregar 100µL (7H9-OADC-PANTA).



7. Transvasar 2 mL de muestra de esputo a tubo Falcon de 15mL o 50 mL.



4. Preparar la solución de trabajo de los antibióticos en la placa de 24 pozos (100 µL de INH y RIF a cada pozo).



8. Agregar 2 mL de la solución NaOH -NALC.



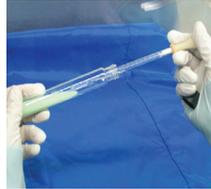
9. Mezclar con vortex los tubos por 20 s, mover el tubo por inversión para homogenizar.



14. Resuspender el sedimento con 2 mL de caldo *Middlebrook 7H9-OADC-PANTA*.



10. Dejar reposar por 15 min a dentro de la CSB.



15. Sembrar en medio sólido L-J 0.2 mL x tubo, agregar 1 mL al caldo 7H9 para MODS y guardar el resto como backup.



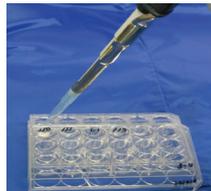
11. Agregar PBS por muestra.



16. Homogenizar bien la suspensión evitando la formación de burbujas de aire.



12. Centrifugar por 15 min a 3000 g.



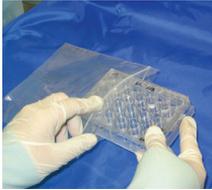
17. Distribuir 900 μ L, de la suspensión final de la muestra, hasta que la placa este llena excepto la columna 3.



13. Decantar el sobrenadante.



18. Dispensar 900 μ L del medio 7H9-OADC-PANTA, sin muestra en los cuatro pozos de la columna 3 (controles negativos internos).



19. Cerrar las placas con su respectiva tapa y colocar en una bolsa tipo ziplock.



23. Cerrar la placa y colocar en una bolsa tipo ziplock.



20. Incubar a 37 °C y, posteriormente, proceder a la lectura a partir del quinto día.



24. Incubar a 37 °C junto a las placas de las muestras procesadas el mismo día.



21. Mezclar 5 μ L de cada suspensión de cepas ajustadas a la escala de 1 de MacFarland con 5 mL de medio 7H9-OADC.



26. La lectura de las placas se inicia por los controles internos y examinados e interpretados correctamente antes de que los resultados se consideren válidos.



22. Dispensar los controles positivos en los pozos no utilizados, donde se preparó la solución de antibióticos.



27. El crecimiento de MTB se caracterizan por que las colonias lucen como pequeñas curvas, comas o espirales.

Fuente: Laboratorio de Micobacterias - INS.

ANEXO A (continuación)
DISTRIBUCIÓN FINAL DE LA PLACA MODS

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	
A	1 Control sin droga	2 Control sin droga	3 Control negativo	4 Control sin droga	5 Control sin droga	6 Control sin droga
B	Control sin droga	Control sin droga	Control negativo	Control sin droga	Control sin droga	Control sin droga
C	INH 0,4 µg/mL	INH 0,4 µg/mL	Control negativo	INH 0,4 µg/mL	INH 0,4 µg/mL	INH 0,4 µg/mL
D	RIF 1,0 µg/mL	RIF 1,0 µg/mL	Control negativo	RIF 1,0 µg/mL	RIF 1,0 µg/mL	RIF 1,0 µg/mL

INH: isoniacida

RIF: rifampicina

ANEXO B PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIO DE CULTIVO

BUFFER FOSFATO

Buffer fosfato pH 6,8; 0,067M

Componentes

Fosfato de sodio di-básico anhidro	Na_2HPO_4	9,47 g
Fosfato de potasio monobásico en cristales	KH_2PO_4	9,07 g
Agua destilada		2 000 mL

Preparación

Solución A: Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico).

Disolver 9,47g de fosfato de sodio dibásico en 1000 mL de agua destilada.

Solución B: KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico).

Disolver 9,07 g de fosfato de potasio monobásico en 1000 mL de agua destilada.

Solución final del *buffer* fosfato (pH 6,8).

(Un volumen aproximado de 1900 mL – es suficiente para al menos 190 muestras)

Se recomienda que las soluciones *stock* (el volumen total) sean preparadas con anticipación. El volumen total de las soluciones *stock* y las alícuotas que serán almacenadas, pueden ajustarse de acuerdo con las necesidades del laboratorio.

Procedimiento

Mezclar 950 mL de la solución A con 950 mL de la solución B, separar 50 mL de cada solución para ajustar el pH si fuera necesario.

Medir el pH, el cual debe estar en $6,8 \pm 0,2$. Para ajustar: añadir la solución A para aumentar el pH. Añadir la solución B para bajar el pH.

Esterilice en la autoclave a 121-124 °C por 15 min.

Rotular con el nombre del *buffer* y fecha de preparación.

Para confirmar la esterilidad de la solución *buffer* fosfato, colocar una alícuota de 100 µl en un medio de agar nutritivo e incubar por 48 h a 37 °C.

Almacenar en el refrigerador a 2-8 °C por un mes.

Notas

Cada muestra de esputo requiere 10 mL de la solución *buffer* fosfato (pH 6,8). La solución *buffer* estéril puede ser almacenada en botellas estériles de 50-200 mL para ser usadas en el día o ser almacenada en volúmenes mayores. Si se almacenan en volúmenes mayores, se puede alicuotar la cantidad necesaria de *buffer* el mismo día del proceso de las muestras, usando técnicas estériles.

SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE (NaOH-NALC)

Solución stock de NaOH – citrato de Na (4% NaOH/2,9% citrato de sodio para la descontaminación de las muestras de esputo).
(400 mL – suficiente para 200 muestras).

Componentes

Hidróxido de sodio	8,0 g
Citrato de sodio	5,8 g
Agua destilada	400 mL

Procedimiento

Disolver 8,0 g de hidróxido de sodio en 200 mL de agua destilada.
Disolver 5,8 g de citrato de sodio en otros 200 mL de agua destilada.
Combinar las soluciones de hidróxido de sodio y citrato de sodio (en volúmenes iguales).
Mezclar y esterilizar en el autoclave a 121-124 °C por 15 min.
Rotular con el nombre del reactivo y fecha de preparación.
Almacenar en refrigeración a 2-8 °C por un mes.

Notas

Cada 2 mL de muestra de esputo requiere 2mL de solución NaOH – citrato de Na.
Se puede almacenar la solución *stock* en alícuotas de menor volumen usando tubos tapa rosca, el volumen apropiado va a depender de la cantidad de muestras que se procesan por día.
Disolver 0,1g de los cristales de NALC por cada 20 mL de la solución de descontaminación (0,5% de NALC en NaOH-citrato de Na = solución de descontaminación NaOH-NALC).

Preparación de la solución de descontaminación

Número de muestras	Mix:	
	Stock de NaOH-Na Citrato (ml)	NALC (g)
10	20	0.1
20	40	0.2
50	100	0.5
100	200	1.0

Notas

Descartar el remanente de la solución de descontaminación NaOH-NALC no utilizado, porque después de 24 horas el NALC pierde su acción mucolítica.

CALDO MIDDLEBROOK 7H9

Medio líquido Middlebrook 7H9 con casitona y glicerol (900 mL suficiente para 200 muestras).

Componentes

Caldo base Middlebrook 7H9	5,9 g
Glicerol	3,1mL
Casitona	1,25 g
Agua destilada estéril	900ml

Procedimiento

Disolver 5,9 g del medio 7H9 en polvo en 900ml de agua destilada estéril conteniendo 3,1 mL de glicerol y 1,25 g de casitona.

Mezclar en constante agitación hasta que esté completamente disuelto (se recomienda usar pastillas magnéticas en el mezclador).

Esterilizar en la autoclave a 121-124 °C por 15 min.

Enfriar y alicuotar 4,5 mL del medio en tubos de vidrio estériles de 16x 100 mm para las muestras y alícuotas de 10,8 mL, para la preparación de las soluciones de antibióticos y para los controles internos.

Tomar una muestra al azar de los tubos e incubarlos a 37 °C por 48 horas luego dejarlos a temperatura ambiente durante las subsiguientes 48 horas para controlar la esterilidad (que se traduce como ausencia de turbidez).

Registrar el lote, la fecha de preparación y el volumen.

Disponer que se haga el control de sensibilidad del lote.
Registrar el día en que se pone en uso y el día en que se termine cada lote.
Almacenar el frasco y los tubos con las alícuotas de medio 7H9 con las tapas bien cerradas a 2-8 °C por el periodo de un mes.

Notas

Cada muestra de esputo y los controles internos requieren tubos que contengan 4,5 mL de medio 7H9.

Cada tubo con 10,8 mL de medio 7H9 es suficiente para preparar las soluciones de antibióticos y para los controles internos de quince muestras de esputo. La cantidad a prepararse (mL) depende de las necesidades de cada laboratorio. Si se almacena en frascos de mayor volumen, se puede repartir el medio de forma estéril el mismo día de proceso de las muestras.

Mezcla de antibióticos

PANTA

Es una mezcla de antibióticos que se comercializa en forma liofilizada y que puede ser agregada al medio Middlebrook 7H9. Luego de reconstituida en agua destilada estéril (3 mL), la mezcla contiene por mL de solución:

Polimixina B	2000 unidades
Anfotericina B	200 µg
Acido nalidixico	800 µg
Trimetoprima	200 µg
Azlocilina	200 µg

La solución debe ser utilizada dentro de las 72 h después de reconstituirla. Si se quiere mantener la eficiencia del PANTA por más tiempo, se debe de alícuotar en crioviales cantidades de 500 µL aproximadamente, para luego colocarlas en refrigeración a -20 °C por un mes.

ANEXO C PREPARACIÓN DE ANTIBIÓTICOS

STOCK DE INH (8 mg/mL)

Componentes

Isoniacida	20 mg
Agua destilada estéril	2,5 mL

Procedimiento

Disolver completamente 20 mg de INH en 2,5 mL de agua destilada estéril.
Filtrar empleando un jeringa de 0,2 μ m para solventes acuosos.
Almacenar en alícuotas de 20 μ l en tubos estériles de microcentrífuga a -20 °C hasta por 6 meses.

Notas

Cada alícuota almacenada de 20 μ l es suficiente para 100 muestras (incluyendo sobrantes).

STOCK DE RIF (8 mg/mL)

Componentes

Rifampicina	20 mg
Dimetil sulfoxido	1,25 mL
Agua destilada estéril	1,25 mL

Procedimiento

Disolver completamente 20 mg de RIF en 1,25 mL de DMSO.
Añadir 1,25 mL de agua destilada estéril y mezclar.
Filtrar empleando un filtro de jeringa de 0,2 μ m para solventes orgánicos.
Almacenar en alícuotas de 20 μ l en tubos estériles de microcentrífuga a -20 °C hasta por 6 meses.

Notas

Cada alícuota almacenada de 20 μ l es suficiente para 100 muestras (incluyendo sobrantes).

Cada alícuota congelada de 8 mg/mL de la solución *stock* de antibiótico es suficiente para 100 pozos de INH o RIF.

Los volúmenes de 2 mL de medio y la solución de trabajo de los antibióticos preparados en la columna 2 son suficientes para tres placas de MODS (que corresponde a quince muestras de esputo, tres controles negativos y dos controles positivos, estos últimos van en una placa aparte).

Si se van a procesar mas muestras se puede emplear la columna 3 (y la columna 4 si fuera necesario), de la misma manera que la columna 2 (colocar 2 mL de 7H9-OADC en la columna 3 y seguir el procedimiento antes mencionado).

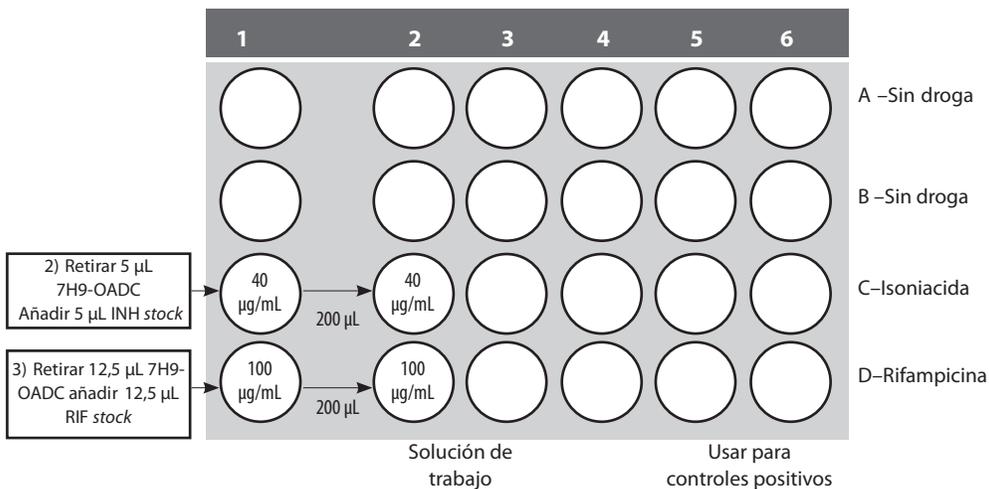
Cuando se realicen los cálculos para la preparación de la solución de trabajo, hay que recordar en incluir los controles negativos en cada placa y los controles positivos así como tener en cuenta las posibles perdidas.

No congele o reuse de nuevo la solución *stock* y la solución de trabajo de antibióticos, porque la actividad de los antibióticos se puede perder. Descarte al final todo el resto de la solución *stock* de antibióticos que no se empleó.

Dilución de la solución de trabajo de los antibióticos

Solución <i>stock</i> de antibióticos	Dilución del <i>stock</i> en 7H9-OADC para generar el <i>stock</i> 2	Dilución del <i>stock</i> 2 en 7H9-OADC para generar la solución de trabajo	Concentración final en los pozos cuando se añade la muestra (µg/mL)	
Isoniacida 8 mg/ml	5 µL <i>stock</i> /995 µL 7H9-OADC (40 µg/ml)	1/10 4 µg/mL	INH	0,4
Rifampicina 8 mg/ml	12,5 µL <i>stock</i> /987,5 µL 7H9-OADC (100 µg/ml)	1/10 10 µg mL	RIF	1,0

Añadir 1mL 7H9-OADC
 pozos C y D- columna1
 2 mL a todo los pozos- columna



4) Retirar 200 µL 7H9-OADC de los pozos 2C & 2D
 Añadir 200 µL del stock 2 de INH & RIF a los pozos respectivos (dilución 1 en 10)

ANEXO D ESCALA ESTANDAR DE MCFARLAND 1.0

La preparación de la suspensión de bacterias ajustada a la escala Mac Farland N.º1 debe llevarse a cabo solo en cabinas de bioseguridad clase II, tipo A2.

Si las cepas control no están comercialmente disponibles, se pueden emplear cepas locales caracterizadas y con un patrón de susceptibilidad conocido, cepa sensible a todas las drogas, y cepa mono resistente a RIF y mono resistente a INH.

Requisitos

Cepa H₃₇Rv de MTB ATCC 27294 (control sensible) o cepa de referencia pan sensible.

Cepa mono resistente a RIF

Cepa mono resistente a INH.

Agar Middlebrook 7H11–5% OADC en placas Petri

Solución estéril de *Tween* 80 al 10%

40 µL

Agua destilada estéril

10 mL

Procedimiento

- Reconstituir con la solución acompañante la cepa control comercialmente preparado.
- Colocar la solución de la cepa en una placa Petri conteniendo agar Middlebrook 7H11 (recuperación y criopreservación de cultivos positivos de MODS).
- Incubar a 37 °C por 15-20 días.
- El mismo día de la preparación de la suspensión de la cepa (MacFarland 1), mezclar 10 mL de agua destilada estéril y 40µL de solución estéril de *Tween* 80 al 10% en un tubo estéril (concentración final de *Tween* = 0,04%)
- Utilizando un asa de siembra estéril, extraer varias colonias de micobacterias y colocarlas en un tubo estéril con perlas de vidrio que contenga 100 µL de la solución salina *Tween* 80.
- Asegurar fuertemente la tapa del tubo y mezclar en el agitador por 2-3 minutos; dejar reposar por cinco minutos.
- Abrir el tubo y añadir 3 mL de la solución salina *Tween* 80, asegurar bien la

tapa del tubo y mezclar en el agitador por 20 segundos.

- Dejar reposar por 30 minutos.
- Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril empleando una pipeta de transferencia.
- Ajustar la turbidez a la escala 1 de MacFarland (aprox. 3×10^8 UFC/mL) con solución salina *Tween* 80.
- La suspensión de bacterias a escala 1 de MacFarland se debe mantener bien sellada y refrigerada a 2 - 8 °C para ser empleada posteriormente por un periodo no mayor a 15 días.
- El resto de colonias que quedan en la placa Petri pueden ser repicados en una nueva placa Petri con agar 7H11 para mantener futuros repiques.
- Prepararlas para congelarlas por un largo periodo.

Notas

Las cepas bien caracterizadas de MTB (una cepa sensible y cepas mono resistentes a INH y RIF) son usadas como controles positivos, estos se emplean cada vez que las muestras clínicas se procesan para MODS. Los controles positivos evalúan la calidad del medio y la efectividad de los antibióticos. Para disminuir el riesgo de contaminación cruzada, estos controles positivos son procesados y colocados en una placa diferente, este proceso se realiza después de que las muestras clínicas hayan sido procesadas y selladas en bolsas plásticas tipo *ziplock*.

Para evaluar la contaminación cruzada se debe de correr los controles internos negativos en cada placa.

ANEXO E ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

a) Cepas de referencia para control de calidad

- Cepa de MTB H37Rv pansensible, procedentes de ATCC (*American Type Culture Collection*) o de los Laboratorios Supranacionales de la OPS/OMS.
- Cepa resistente a isoniacida ATCC
- Cepa resistente a rifampicina ATCC o de los Laboratorios Supranacionales de la OPS/OMS.

b) Control de calidad interno

- La cepa de referencia **sensible**, debe ser utilizada cada vez que se corre la prueba. La cepa sensible no debe tener crecimiento en medios que contienen concentración crítica de los medicamentos. Si se observa crecimiento la prueba no es válida y debe repetirse.
- Las cepas de referencia **Resistente**, debe ser utilizada cada vez que se corre la prueba. La cepa resistente crece en los medios que contiene las concentraciones críticas. Si no se observa crecimiento la prueba no es válida y debe repetirse.

c) Controles internos negativos

- Los controles internos negativos se realizan en cada placa con las muestras que se procesa cada día, los resultados se deben registrar en las hojas de trabajo junto con los resultados de las muestras.

c) Control de esterilidad del medio Medio líquido (caldo 7H9) en tubos

- Verificar que el caldo sea transparente, ligeramente amarillo.
- Seleccionar al azar cinco tubos de cada lote de medio recién preparado e incubar a 37 °C, entre 48 a 72 h.
- Verificar que los caldos incubados se mantengan transparentes; si presentan turbidez descartar todo el lote preparado.

d) Eliminación de las placas

- Mantener todas las placas en sus respectivas bolsas *ziplock*, colocarlas en bolsas de autoclave y sellar la bolsa.
- Esterilizar en la autoclave a 121-124 °C durante 45-60 minutos.
- Descartar las bolsas de autoclave ya esterilizadas en los lugares designados para este propósito.

Nota

Una vez que las placas de MODS estén con las muestras, estas permanecerán en sus bolsas *ziplock* selladas, así contengan cultivos positivos o no.

ANEXO F LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados para la mayoría de las muestras procesadas por MODS son claramente positivas (muchas colonias) o claramente negativas (no hay crecimiento). La dificultad se presenta únicamente cuando el crecimiento es mínimo o si la contaminación está presente.

Pozo A	Pozo B	Interpretación
+	+	Positivo
-	-	Negativo
+	C	Contaminado
C	+	Contaminado
-	C	Contaminado
C	-	Contaminado
C	C	Contaminado
+/-	C	Contaminado
C	+/-	Contaminado
+	-	Indeterminado
-	+	Indeterminado
+	+/-	Indeterminado
+/-	+	Indeterminado
-	+/-	Indeterminado
+/-	-	Indeterminado
+/-	+/-	Indeterminado

+ significa ≥ 2 ufc en el pozo

+/- significa 1 ufc en el pozo

- significa no crecimiento en el pozo

C significa contaminación en el pozo y no crecimiento visible de MTB

Susceptibilidad a isoniacida y rifampicina		
Pozo C INH 0,4 µg/mL	Pozo D RIF 1,0 µg/mL	Interpretación
+	+	MDR
-	-	Sensible a isoniacida y rifampicina
+	-	Resistente a isoniacida, sensible a rifampicina
+	C	Resistente a isoniacida, rifampicina indeterminado
+	+/-	Resistente a isoniacida, rifampicina indeterminado
-	+	Sensible a Isoniacida y resistente a rifampicina,
C	+	Isoniacida indeterminado, resistente a rifampicina
+/-	+	Isoniacida indeterminado, resistente a rifampicina,

ANEXO G FORMULARIO DE REPORTE DE RESULTADOS

		FORMULARIO										FOR-001 Placa N°	
		PRUEBA DE CULTIVO Y SUSCEPTIBILIDAD DIRECTA A FÁRMACOS POR EL MÉTODO DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)										Edición N° 01 Página 01 de 01	
Responsable del proceso:		Lectura	1 ^{ra}	2 ^{da}	3 ^{ra}	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^{ma}	8 ^{va}	Interpretación de resultados (según Anexo 5 de la Guía MODS UPGH versión 12.1.)		
Fecha de proceso:		Fecha											
Fecha de proceso:		H ₂ O ₂ Rv										Cultivo	
Código de Controles Positivos		MDR										Susceptibilidad	
Código de origen		C ₁										Cultivo	
Código de origen		C ₂										Susceptibilidad	
Código de origen		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código de origen		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Controles Negativos		(contaminación cruzada)										Contaminación cruzada	
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		Responsable de lectura										Fecha de resultados:	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}										Susceptibilidad	
Código INS		RIF _{1,2}										Susceptibilidad	
Fecha de resultados:													
Código INS		Código de origen										Cultivo	
Código INS		C ₂										Susceptibilidad	
Código INS		INH _{1,2}		</									

ANEXO H

EJEMPLO DEL REGISTRO DEL FORMULARIO DE REPORTE DE RESULTADOS

		FORMULARIO										FOR-001 Placa N°		
		PRUEBA DE CULTIVO Y SUSCEPTIBILIDAD DIRECTA A FÁRMACOS POR EL MÉTODO DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)										Edición N° 01 Página 01 de 01		
Responsable del proceso:		Lectura	1 ^o	2 ^o	3 ^o	4 ^o	5 ^o	6 ^o	7 ^o	8 ^o	Interpretación de resultados (según Anexo 5 de la Guía MODS UPCH versión 12.1)			
Bilga Margoth Acurio		Fecha	10/11/2008	12/11/2008	14/11/2008	17/11/2008	19/11/2008	21/11/2008	24/11/2008	26/11/2008				
Fecha de proceso:														
05/11/2008														
H ₂ O ₂ Rv														
C ₁		+	/								Cultivo	Positivo		
C ₂		+	/											
INH ₄		-	/								Susceptibilidad: Sensible a INH Sensible a RIF			
RIF ₁₉		-	/											
Código de Controles Positivos														
001-08														
MDR														
C ₁		+	/								Cultivo	Positivo		
C ₂		+	/											
INH ₄		+	/								Susceptibilidad: MDR			
RIF ₁₉		+	/											
Fecha de resultados:											10/11/2008			
Código INS														
10-00001-08														
Código de origen														
150														
C ₁		+	/								Cultivo	Positivo		
C ₂		+	/											
INH ₄		+	/								Susceptibilidad: MDR			
RIF ₁₉		+	/											
Fecha de resultados:											10/11/2008			
Código INS														
10-00015-08														
Código de origen														
156														
C ₁		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cultivo	Negativo		
C ₂		-	-	-	-	-	-	-	-	-				
INH ₄		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Susceptibilidad: Negativo			
RIF ₁₉		-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Fecha de resultados:											26/11/2008			
Controles Negativos														
(contaminación cruzada)														
C ₁		-	-	-	-	-	-	-	-	-	Contaminación cruzada Negativo			
C ₂		-	-	-	-	-	-	-	-	-				
C ₃		-	-	-	-	-	-	-	-	-				
C ₄		-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Código INS														
10-00016-08														
Código de origen														
160														
C ₁		-	-	+	/								Cultivo	Positivo
C ₂		-	-	+	/									
INH ₄		-	-	-	/								Susceptibilidad: Sensible a INH Resistente a RIF	
RIF ₁₉		-	-	+	/									
Fecha de resultados:											14/11/2008			
Código INS														
10-00024-08														
Código de origen														
203														
C ₁		+	/								Cultivo	Positivo		
C ₂		+	/											
INH ₄		+	/								Susceptibilidad: Resistente a INH Sensible a RIF			
RIF ₁₉		-	/											
Fecha de resultados:											10/11/2008			
Código INS														
10-00081-08														
Código de origen														
210														
C ₁		+	/								Cultivo	Positivo		
C ₂		+	/											
INH ₄		-	/								Susceptibilidad: Sensible a INH Sensible a RIF			
RIF ₁₉		-	/											
Responsable de lectura		Margoth Acurio	Lourdes García	Margoth Acurio	Margoth Acurio	Margoth Acurio	Lourdes García	Margoth Acurio	Lourdes García	Fecha de resultados:			10/11/2008	
Banda:														
C ₁		Prueba de cultivo MODS				Prueba de susceptibilidad a drogas MODS						Referencia técnica:		Guía MODS UPCH versión 12.1 (2008)
C ₂		+; Positivo				+; Resistente						Leto de medio 7H8:		35 (15/11/08)
C ₃		-; Negativo				-; Sensible						Supervisor:		Blgo. Luis Azeano
INH ₄		+/-; Indeterminado				+/-; Indeterminado								
RIF ₁₉		C; Contaminado				C; Contaminado								
C ₄		Control sin droga y sin muestra				MDR: Multirresistente (INH + RIF)								

ANEXO I

CRIOCONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE LOS CULTIVOS MODS

Preparación del caldo Middlebrook 7H9 con 10% de glicerol para la criopreservación de las cepas

Componentes

Caldo base Middlebrook 7H9 0,94 g

Glicerol 20 mL

Agua destilada estéril 160 mL

Suplemento ADC 20 m

Procedimiento

1. Disolver 0,94 g del caldo base Middlebrook 7H9 en 160 mL de agua destilada estéril y añadir 20 mL de glicerol.
2. Agitar constantemente (se puede emplear un agitador magnético) hasta que se disuelva por completo.
3. Esterilizar en la autoclave a 121-124 °C por 15 minutos.
4. Dejar que baje la temperatura y añada 20 mL del suplemento enriquecedor ADC
5. Mezcle bien y verifique la esterilidad del medio incubándolo a 37 °C por 24-48 horas
6. Dispense 0,9 mL en crioviales en condiciones estériles, asegure bien la tapa y almacene a 2-8 °C.

• **Nota:** para este proceso se emplea ADC y **no OADC**

Crioconservación de las cepas

1. Coloque en el interior de la cabina de bioseguridad biológica las placas Petri con agar 7H11 que contiene los subcultivos (cepas) obtenidas a partir de MODS.
2. Abra la placa Petri con cuidado y coseche las colonias con un asa de siembra estéril. Añadir un asa completa de cepa a cada criovial conteniendo caldo 7H9 con 10% de glicerol.

3. Sellar bien el vial y agitar por 10-15 segundos para homogenizar las cepas
4. Almacenar a -70 °C (se puede almacenar a -20 °C si -70 °C no está disponible).
5. Las colonias restantes pueden utilizarse para realizar ensayos adicionales (pruebas moleculares, pruebas indirectas de sensibilidad a los antibióticos, etc.)
6. Colocar todo el material infeccioso para descartar en una bolsa de autoclave y sellar.
7. Esterilizar en la autoclave a 121-124 °C por 45-60 minutos.

Este documento se terminó de imprimir
en los talleres gráficos de AGL gráfica color SRL
Pasaje Monte Eucalipto 140-Santiago de Surco
Telf.: (511) 242-7199
2012

.

ISBN: 978-612-310-002-5



9 786123 110025



Instituto Nacional de Salud
Jirón Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú
Teléfonos: (0511) 617-6200 Fax: (0511) 617-6244
Correo electrónico: postmaster@ins.gob.pe
Página web: www.ins.gob.pe

