

SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS) MET-CNSP-051


Elaborado por: CNSP Blga. Margoth Acurio Usca
CNSP Blga. Neyda Quispe Torres

Revisado por: CNSP Blgo. Luis Asencios Solís
CNSP Blga. Teresa Huamán Meza
CNSP Blga. Gabriela Salinas Coronel

Aprobado por: CNSP Med. Luis Alberto Vergara Fernández

RD N° 203-2016-DG-CNSP/INS


Fecha: 01 / 08 /2016

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

INDICE

	CARATULA	1
	INDICE	2
1.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	3
2.	REFERENCIAS	3
3.	DEFINICIONES OPERATIVAS	3
4.	FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO	4
5.	DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO	6
5.1	Condiciones previas: Infraestructura y Bioseguridad	6
5.2	Aspectos de Bioseguridad	6
5.3	Tipo de muestra	6
5.4	Equipos	7
5.5	Materiales y reactivos	7
5.6	Etapa de pre análisis	8
5.7	Etapa de análisis	10
6.	CÁLCULOS	13
7.	INFORME DE RESULTADOS	13
8.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	13
9.	FORMULARIOS	15
10.	ANEXOS	15

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición N° 01

El método descrito se aplica en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud y Laboratorios de la red donde se ha realizado la transferencia tecnológica del método.

2. REFERENCIAS

Kent P, Kubica G. Public Health Mycobacteriology a Guide For the Level III Laboratory. U.S Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control. 1985.

Serie de Normas Técnicas N° 15 Manual de Procedimientos de Laboratorio para la Obtención y envío de muestras (I). Instituto Nacional de Salud – 2da Edición -1997.

Serie de Normas Técnicas N° 18 Manual Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos, Biomédicos y Clínicos – Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud – 3ra Edición - 2005.

3. DEFINICIONES OPERATIVAS

Baciloscopía: Técnica para la observación de Bacilo Alcohol-Acido Resistente (BAAR) en frotis de muestras de esputo, teñidos por la técnica de Ziehl-Neelsen..

Buffer fosfato pH 6,8: El tampón fosfato es un sistema muy eficaz, para amortiguar ácidos, para mantener el pH de los medios biológicos dentro de los valores compatibles con la vida.


Cepa sensible: Es una cepa que no crece en presencia de una concentración crítica de una droga.

Cepa resistente: Es una cepa, que crece a una concentración crítica establecida para una determinada droga.

Contaminación: Crecimiento de otros microorganismos en el medio de cultivo preparado para aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

Control de calidad: Medidas internas y externas adoptadas para garantizar la calidad de los resultados de la prueba.

Criopreservación: Es el proceso en el cual las unidades viables de la bacteria son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente a -80°C para disminuir las funciones vitales del organismo, para mantener en condiciones de *vida suspendida* por mucho tiempo.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

Cultivo puro: Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismo, los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo tengan la misma composición genética, son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos e identificarlos con seguridad.

Concentración crítica: Es la cantidad precisa de cada droga que contiene el medio.

Droga: una sustancia química que tiene efectos biológicos conocidos en humanos o animales.

Sensibilidad de la prueba: Es la capacidad de la prueba para detectar a los verdaderos resistentes.

Especificidad de la prueba: Es la capacidad de la prueba para detectar a los Verdaderos sensibles.

Estándar McFarland: El patrón estándar Mc Farland se usa como una referencia para ajustar la turbidez de suspensiones bacterianas de manera que el número de bacterias estén dentro de un rango establecido en el estándar

Prueba de susceptibilidad: Es la capacidad de la prueba para detectar la verdadera sensibilidad o resistencia de la bacteria a los medicamentos antituberculosis.

Medio Lowenstein-Jensen: medio de cultivo sólido a base de huevo usado para el crecimiento de micobacterias


Medicamentos antituberculosis: Sustancias químicas con propiedades bactericidas o bacteriostáticas para complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Medio de cultivo: solución líquida o solidificada estéril que contiene nutrientes necesarios para el crecimiento de la bacteria.

Microcolonias: Colonias muy pequeñas que son visualizadas a través de un microscopio.

Proporción crítica o criterio de resistencia: Es la proporción de mutantes resistentes de una población de bacterias por encima de la cual la cepa es considerada resistente.

Tuberculosis (TB): La tuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*, afecta principalmente a los pulmones, aunque puede comprometer a cualquier otro órgano. La infección se transmite por vía aérea al inhalar aerosoles provenientes de la tos o estornudo de la persona enferma.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

Tuberculosis sensible: Es una forma de TB, cuyo patrón de susceptibilidad no muestra resistencia a los medicamentos antituberculosis.

Tuberculosis multidrogo-resistente (TB MDR): Se refiere a la tuberculosis que presenta resistencia, simultánea a isoniacida y rifampicina.

Velocidad de crecimiento: Tiempo de crecimiento de las colonias.

SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection.

AC: Aseguramiento de la calidad

BAAR: Bacilo alcohol ácido resistente.

CSB: Cabina de seguridad biológica.

CC: Control de calidad

CCI: Control de calidad interno

DMSO: Dimetil sulfoxido.

ESN-PCT: Estrategia Sanitaria Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis.

EEC: evaluación externa de calidad.

EPP: equipo de protección personal.

INH: Isoniacida.

INS: Instituto Nacional de Salud.

MDR: Multidrogosresistente.

MODS: Susceptibilidad a Drogas 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

4. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO

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 de luz invertida. El método, ha sido diseñado para la detección del crecimiento de la bacteria y la susceptibilidad a INH y RIF.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

5. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ENSAYO

5.1. Condiciones previas

El laboratorio debe contar con todos los equipos requeridos para la ejecución del método en buen funcionamiento.

5.2. Aspectos de bioseguridad


La prueba MODS requiere para su ejecución de un laboratorio con Nivel de Bioseguridad II y III, se aplican las medidas más estrictas de bioseguridad y protección personal en todas las etapas del proceso, con equipos de contención primaria, elementos de protección personal como uso de batas, gorro, botas, doble guantes (guantes nitrilo y guantes de látex), respirador N95 y la ejecución de los procedimientos técnicos en forma correcta.

Así mismo se tiene que aplicar medidas generales de bioseguridad, según el documento Bioseguridad en el Laboratorio.

- 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 y 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 0,5%.
- En caso ocurra derrame de material infeccioso sobre las superficies de trabajo, deben ser descontaminadas inmediatamente, de acuerdo al 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 del método.

5.3. Tipo de Muestra

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, pacientes nunca tratados, recaídas, abandonos recuperados.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

5.4. Equipos

Área de preparación de medios

- 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).
- Micropipeta multicanal 100 μ L
- Micropipetas automáticas (1000 μ L, 200 μ L, 20 μ L).


Equipos Área de procesamiento de muestras

- Microscopio de luz invertida (objetivos 4x y 10x).
- Cabina de Seguridad Biológica clase II, tipo A2
- Estufa incubadora 36 - 37 °C
- Refrigeradora
- Computadora con scanner
- Congelador -86 °C
- Agitador de tubos
- Densitómetro
- Centrífuga refrigerada

5.5 Materiales y reactivos

Materiales

- Tubos de vidrio con tapa rosca de 16/100 mm.
- Micropipetas automáticas (1000 μ L, 200 μ L y 20 μ L).
- Pipetas multicanal de 100 μ L.
- Termómetros (control de temperatura).
- Tubos de centrifuga estéril de 15 mL y 50 mL de polipropileno (base cónica).
- Pipetas serológicas de 10 mL.
- Pipetas de transferencia estériles de 3,5mL.
- Tips de 20 μ L, 200 μ L, 1000 μ L con y sin filtro.
- Microplacas de polipropileno de 24 pozos de fondo plano.
- Bolsas de polietileno tipo ziplock.
- Filtros para jeringa de 0,2 μ m (para solventes acuosos).
- Filtros para jeringa de 0,2 μ m (para solventes orgánicos).
- Probeta graduada de 1000mL, 500mL, 250mL y 50 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 1000 mL y 2000 mL.
- Frascos de vidrio resistente a altas temperaturas de 100mL, 250mL, 500mL y 1000mL.
- Propipetas de jebe.
- Embudo de plástico de 15 cm de diámetro.
- Gradilla para tubos de 16 x 100 mm.
- Gradillas para tubos de centrifuga de 50 mL.
- Bolsas de bioseguridad.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

- Crioviales de 2 mL.
- Plumón indeleble.
- Cinta indicadora para autoclave.
- Cinta indicadora para horno.
- Parafilm "M".
- Papel aluminio.
- Papel "glycine".
- Espátulas pequeñas y delgadas de acero inoxidable (para pesar).
- Jeringas 10 mL estériles descartables
- Barra magnética.
- Plumón indeleble.
- Papel absorbente plastificado
- Silicagel absorbente de humedad
- Criobox

Reactivos e Insumos.

- Caldo Middlebrook 7H9.
- Casitona (caseína pancreática digestiva).
- PANTA (suplemento antimicrobiano)
- OADC enriquecedor (ácido oleico–albúmina–dextrosa-catalasa)
- ADC enriquecedor (albúmina–dextrosa-catalasa)
- Dimetil sulfóxido (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
- Glicerol 99,5% QP.
- Agua destilada estéril.
- 70% v/v etanol.
- Tween 80
- Estándar McFarland 1,0.


5.6. Etapa de pre – análisis

Conservación de muestras en el laboratorio antes del análisis:

Si la muestra no se procesa el mismo día de la recolección, conservarla en refrigeración de 2 a 8°C. Procesar la muestra dentro de las 72 horas de haber sido recolectada.

5.6.1 Preparación del medio de cultivo 7H9 con OADC y PANTA

- Separar en tubos de polipropileno de 50 mL, el volumen requerido de la solución buffer fosfato (pH 6,8 para utilizar en el proceso de descontaminación).
- Separar en tubos de polipropileno de 50 mL la solución stock de NaOH-citrato de sodio, para la descontaminación de las muestras de esputo).


	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

- Disponer de tubos con 4.5 mL de caldo 7H9: un tubo para cada muestra de esputo, 3 tubos para las tres cepas controles y un tubo para control negativo por cada placa.
- Disponer de un tubo con 10.8mL de caldo 7H9 para realizar la dilución de antibióticos.
- Adicionar 0.5ml de OADC a cada tubo conteniendo 4.5ml de caldo 7H9 (7H9-OADC), y que serán utilizados para trabajar las muestras, los controles negativos y controles positivos.
- Añadir 1.2ml de OADC al tubo conteniendo 10.8ml de caldo 7H9 (7H9-OADC), para la dilución de antibióticos.
- Separar tres tubos con 5ml de 7H9-OADC para los controles positivos y el tubo con 12ml de 7H9-OADC para realizar la dilución de antibióticos (No requieren PANTA).
- Reconstituir el PANTA con 3 mL de agua destilada estéril y añadir 0.1ml a cada tubo designado para la muestra y a los tubos designados como controles negativos.

5.6.2 Dilución de drogas

La dilución de drogas (INH y RIF) se realiza en placas de 24 pocillos de fondo plano, el día que se va realizar la siembra de las muestras, deben estar rotuladas con los códigos de las muestras y fecha de proceso.

- Retirar de la congeladora la solución stock de los antibióticos (8 mg/mL) y dejar descongelar a temperatura ambiente dentro de cabina.
- Dispensar 1 mL del caldo 7H9+OADC a los pozos C y D de la primera columna de la microplaca.
- Dispensar 2 mL del caldo 7H9+OADC a los cuatro pozos de la segunda columna de la microplaca
- Empleando una micropipeta, retirar 5 µL de medio del pozo "C" de la primera columna y añadir 5 µL de la solución stock de INH. Mezclar bien (0.04 mg/mL=40 µg/mL INH dilución 1)
- Empleando una micropipeta, retirar del pozo "D" de la primera columna 12.5 µL de medio y añadir 12.5 µL de la solución stock de RIF; mezclar bien (0.1 mg/mL =100 µg/mL RIF dilución1)
- Dispensar 2 mL de caldo 7H9+OADC a los 4 pozos A, B, C, y D de la columna 2 de la microplaca.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

5.6.3 Solución de trabajo de las drogas

- Empleando una micropipeta, retirar 200 μ L de los pozos "C" y "D" de la segunda columna.
- adicionar 200 μ L de la dilución 1 de INH al pozo "C" de la segunda columna de la microplaca; mezclar bien (4 μ g/mL INH solución de trabajo).
- Añadir 200 μ L de la dilución 1 de RIF al pozo "D" de la segunda columna de la microplaca; mezclar bien (10 μ g/mL RIF solución de trabajo).
- Empleando una micropipeta multicanal cargar 100 μ L de la solución de trabajo de los pozos A, B, C, y D de la segunda columna y dispensar a los pozos A, B, C, y D de una nueva placa destinada para las muestras y control negativo (el control negativo va en la tercera columna).
- Empleando una micropipeta multicanal cargar 100 μ L de la solución de trabajo de los pozos A, B, C, y D de la segunda columna y dispensar a los pozos A, B, C, y D de la cuarta, quinta y sexta columna de la placa destinada para los controles positivos).

5.6.4 Preparando soluciones para descontaminación de la muestra


- Separar en tubos de polipropileno de 15 o 50 mL, el volumen requerido de la solución buffer fosfato (pH 6.8) para parar la reacción alcalina en el proceso de descontaminación.
- Separar en tubos de polipropileno de 50 mL la solución stock de NaOH-Citrato de sodio, para la descontaminación de las muestras de esputo).
- 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.

5.7 Etapa de análisis

Limpiar la CSB con el desinfectante, delimitar el área contaminada colocando el papel absorbente sobre la mesa de trabajo, desinfectar todos los materiales que se usan en el proceso de la prueba con una gasa o paño embebido en alcohol al 70%, antes de ingresarlos a la CSB.

5.7.1 Procedimiento de descontaminación


- Colocar dentro de la CSB una cubeta de metal con hipoclorito de sodio al 1.0%. para descartar material contaminado que se usa durante el proceso.
- Colocar 2 mL de esputo en un tubo de polipropileno de centrifuga de 15 mL o 50 mL, con ayuda de una micropipeta de transferencia.
- Añadir 2 mL de la solución NaOH-NaLC a una proporción (1:1)

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

- Asegurar bien la tapa y mezclar en el agitador por 20 segundos; mover el tubo por inversión para asegurar que la solución NaOH-NALC este en contacto con todo el interior del tubo y con la tapa.
- Dejar reposar dentro de CSB por un mínimo de 15 minutos. Puede prologarse a 20 minutos más si la muestra es demasiado mucosoide.
- Adicionar buffer fosfato (pH 6,8), para neutralizar la reacción alcalina y terminar con el proceso de descontaminación, mezclar bien invirtiendo el tubo por 4 veces.
- Centrifugar a 3000 g por 15 min.
- Decantar cuidadosamente el sobrenadante en un recipiente que contenga hipoclorito de sodio al 1.0%, mantener el sedimento de la muestra.

5.7.2 Siembra en placas y en medio LJ

- Resuspender el sedimento de la muestra con 2 mL del medio 7H9-OADC-PANTA (5,1mL).
- Homogenizar bien la suspensión evitando formar burbujas de aire.
- De esta suspensión de la muestra extraer 1 mL y hacer la siembra en 2 tubos con medio L-J a razón de 0.2 mL por tubo y el resto conservar en un criovial de 2-8 °C como muestra de contingencia.
- Añadir el otro 1mL 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.
- Dispensar 900 µL de la suspensión final de la muestra a cada uno de los 4 pozos de la placa de 24 pozos. Cada columna corresponde a una muestra.
- 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.


	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

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

- Cada vez que se procesan muestras, deben incluir tres cepas: control positivo sensible, control positivo resistente INH y resistente a RIF.
- Mezclar 5 µL de cada suspensión de cepas (escala MacFarland N°1) con 5ml del medio 7H9+OADC.
- Dispensar 900 µL de cada suspensión de cepas en los 4 pozos de una columna en la placa separada para los controles positivos.
- Cerrar la placa y colocar en la bolsa tipo ziplock sellar.
- Incubar a 37°C junto a las placas correspondientes a las muestras, procesadas el mismo día.

5.7.4 Lectura de las Placas

- Retirar las placas de la incubadora para su observación en el microscopio de luz invertida con las bolsas selladas, las cuales no deben abrirse.
- Realizar las lecturas a partir del quinto día de incubación, iniciando por los controles positivos y luego los pocillos sin drogas.
- Realizar las lecturas iniciales con el objetivo de 10X buscando el temprano crecimiento de las microcolonias, para subsecuentes lecturas utilizar el objetivo de 4X para examinar todo el contenido de cada pocillo.
- Considerar positivo cuando se observa el crecimiento de dos o más unidades formadoras de colonia (≥ 2 ufc) en cada uno de los pozos sin droga.
- Entre los días 5 a 7 días el crecimiento de MTB se asemejan a 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.
- No es muy común la contaminación con bacterias u hongos, pero usualmente aparece al día quinto 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.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

- 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.

6. CÁLCULOS

No aplica

7. INFORME DE RESULTADOS


Los resultados se registran en el sistema informático NETLAB, se realiza la verificación del mismo. Los usuarios autorizados a través de la página Web del INS, pueden acceder al sistema NETLAB, para visualizar los resultados e imprimir y entregar a su respectivo establecimiento.

8. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

8.1 Determinación del crecimiento de micobacterias mediante Cultivo

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

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

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01


8.2 Determinación de la resistencia a medicamentos antituberculosis

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 las drogas antituberculosas
No hay crecimiento en ninguno de los pozos conteniendo droga antituberculosa	Sensible
Crecimiento solo en el pozo con INH	Resistente a INH
Crecimiento solo en el pozo con RIF	Resistente a RIF
Crecimiento en ambos pozos con drogas	MDR
Crecimiento de 1 UFC en cualquier pozo con droga.	Indeterminado para esa droga.
Cualquiera de los pozos con droga contaminado.	Indeterminado para esa droga

- Los pozos con droga sólo deben examinarse cuando los pozos control (sin droga) son positivos (≥ 2 UFC).
- 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.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

- En pocas ocasiones es detectado una sola UFC en los pozos que contienen droga, si esto aconteciera, la interpretación es indeterminada.


9. FORMULARIOS

FOR-CNSP-206: Registro e interpretación de resultados de método MODS – A.
FOR-CNSP-207: Registro e interpretación de resultados de método MODS – B.
FOR-CNSP-208: Información General de Caldo Middlebrook 7H9.
FOR-CNSP-209: Producto final y Control de esterilidad del Caldo 7H9.
FOR-CNSP-210: Información General del Buffer Fosfato Salino (PBS).
FOR-CNSP-211: Información General de la solución descontaminante.

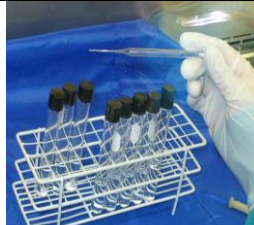

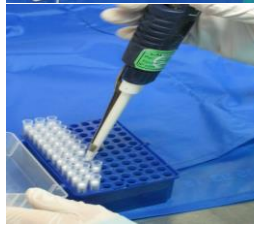


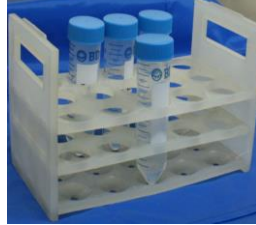


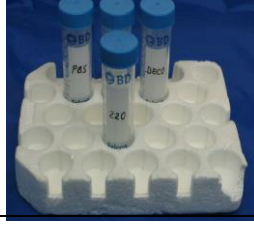





10. ANEXOS


Anexo 01: Flujograma del método de análisis MODS.
Anexo 02: Preparación de caldo 7H9.
Anexo 03: Preparación de buffer fosfato salino.
Anexo 04: Preparación de solución descontaminante (NaOH-Citrato).
Anexo 05: Preparación de droga
Anexo 06: Preparación de escala macfarland 1.0
Anexo 07: Crio conservación de las cepas de los cultivos MODS.
Anexo 08: Preparación final del medio 7H9 y solución descontaminante.
Anexo 09: Dilución de droga para Trabajo.

EL PRESENTE DOCUMENTO SE DISTRIBUYE COMO COPIA NO CONTROLADA Y TIENE UNA VIGENCIA DE 2 AÑOS CONTANDO A PARTIR DE LA FECHA DE SU APROBACIÓN. LA UNIDAD DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DEL CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA PROCESA LAS PROPUESTAS DE MODIFICACIÓN Y ACTUALIZA LAS EDICIONES VIGENTES DEL MISMO.


	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

**ANEXO 01
FLUJOGRAMA DEL MÉTODO DE ANÁLISIS MODS**

	1	Dispensar 4.5 mL de medio 7H9, a los tubos de trabajo.		8	Agregar 2 mL de la solución NAOH – NALC.
	2	Añadir 0.5mL OADC al medio 7H9 (7H9-OADC).		9	Mezclar con vortex los tubos por 20s, mover el tubo por inversión para homogenizar.
	3	Reconstituir el PANTA, agregar 100µL (7H9-OADC-PANTA).		10	Dejar reposar por 15 min a dentro de la CSB.
	4	Preparar la solución de trabajo de la droga en la placa de 24 pozos (100 µL de INH y RIF a cada pozo).		11	Agregar PBS por muestra.
	5	Dispensar los volúmenes requeridos del stock de NaOH-citrato de Na, Buffer fosfato y pesar el NALC cantidad necesaria.		12	Centrifugar por 15 min a 3 000 g.
	6			13	
	7	Transvasar 2 mL de muestra de esputo a tubo Falcon de 15 mL o 50 mL.		14	Resuspender el sedimento con 2 mL de 7H9-OADC-PANTA.


	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

	15	Sembrar en medio sólido L-J 0.2 mL x tubo, agregar 1mL al caldo 7H9 para MODS y guardar el resto como Backup.		21	Dispensar los controles positivos en los pozos no utilizados, donde se preparó la solución de antibióticos.
	16	Homogenizar bien la suspensión evitando la formación de burbujas de aire.		22	Cerrar la placa y colocar en una bolsa tipo Ziplock
	17	Distribuir 900 µL, de la suspensión final de la muestra, hasta que la placa este llena excepto la columna 3.		23	Incubar a 37°C junto a las placas de las muestras procesadas el mismo día.
	18	Dispensar 900µL del medio 7H9-OADC-PANTA, sin muestra en los 4 pozos de la columna 3 (controles negativos internos)		24	Las placas son examinadas bajo el microscopio de luz invertida, a partir del 5to día de incubación.
	19	Cerrar las placas con su respectiva tapa y colocar en una bolsa tipo Ziplock.		25	La lectura de las se inicia por los controles internos y examinados e interpretados correctamente antes de que los resultados se consideren válidos.
	20	Mezclar 5µL de cada suspensión escala de 1 de MacFarland con 5mL de medio 7H9-OADC.		26	El crecimiento de MTB parecen como pequeñas curvas, comas o espirales.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

**ANEXO 01 (Continuación)
DISTRIBUCION FINAL DE LA PLACA MODS**

Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5
Control sin droga	Control sin droga	Control negativo	Control sin droga	Control sin droga
Control sin droga	Control sin droga	Control negativo	Control sin droga	Control sin droga
INH 0,4	INH 0,4	Control negativo	INH 0,4	INH 0,4
RIF 1,0	RIF 1,0	Control negativo	RIF 1,0	RIF 1,0

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición N° 01

ANEXO 02 PREPARACIÓN DEL 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 3,1 mL
Casitona 1,25 g
Agua destilada estéril 900 ml

Procedimiento

Disolver 5,9 g del medio 7H9 en polvo en 900 ml 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 alícuotar 4,5 mL del medio en tubos de vidrio esteriles de 16x 100 mm para las muestras y alícuotas de 10,8 mL, para la preparación de las soluciones de las drogas y para los controles internos.

incubarlo todos los tubos a 37 °C por 48 a 72 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.

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 las drogas y para los controles internos de quince muestras de esputo. La cantidad a prepararse 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.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición N° 01

ANEXO 03 PREPARACION DE BUFFER FOSFATO SALINO

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 1000ml de agua destilada.

Solución B: KH_2PO_4 (Fosfato de potasio monobásico).

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


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

(Un volumen aproximado de 1 900mL – 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 a las necesidades del laboratorio.

Procedimiento

- Mezclar 950mL de la solución A con 950mL de la solución B, separar 50mL de cada
- Solución para ajustar el pH si fuera necesario.
- Medir el pH, debe estar a $\text{pH } 6,8 \pm 0,2$. 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 100µl 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 10ml de la solución buffer fosfato (pH 6.8)
- La solución buffer estéril puede ser almacenada en botellas estériles de 50-200mL para ser usadas en el día o ser almacenada en volúmenes mayores. Si se almacenan en volúmenes mayores, se realiza puede alicuotar la cantidad necesaria de buffer el mismo día del proceso de las muestras, usando técnicas estériles.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

ANEXO 04
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE (NaOH/CITRATO)

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

Componentes

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

Procedimiento

- Disolver 8,0g de hidróxido de sodio en 200mL de agua destilada.
- Disolver 5,8g de citrato de sodio en otros 200mL 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 20ml 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


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

Mezcla de Antibióticos

PANTA

Es una mezcla de antibióticos que se comercializan en forma liofilizada y 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

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

ANEXO 05

PREPARACIÓN DE STOCK DE DROGAS

STOCK DE INH (8 mg/mL)

Componentes

Isoniacida	20 mg
Agua destilada estéril	2,5 mL

Procedimiento

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

Notas:

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

STOCK DE RIF (8 mg/mL)

Componentes


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

Procedimiento

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

Notas:

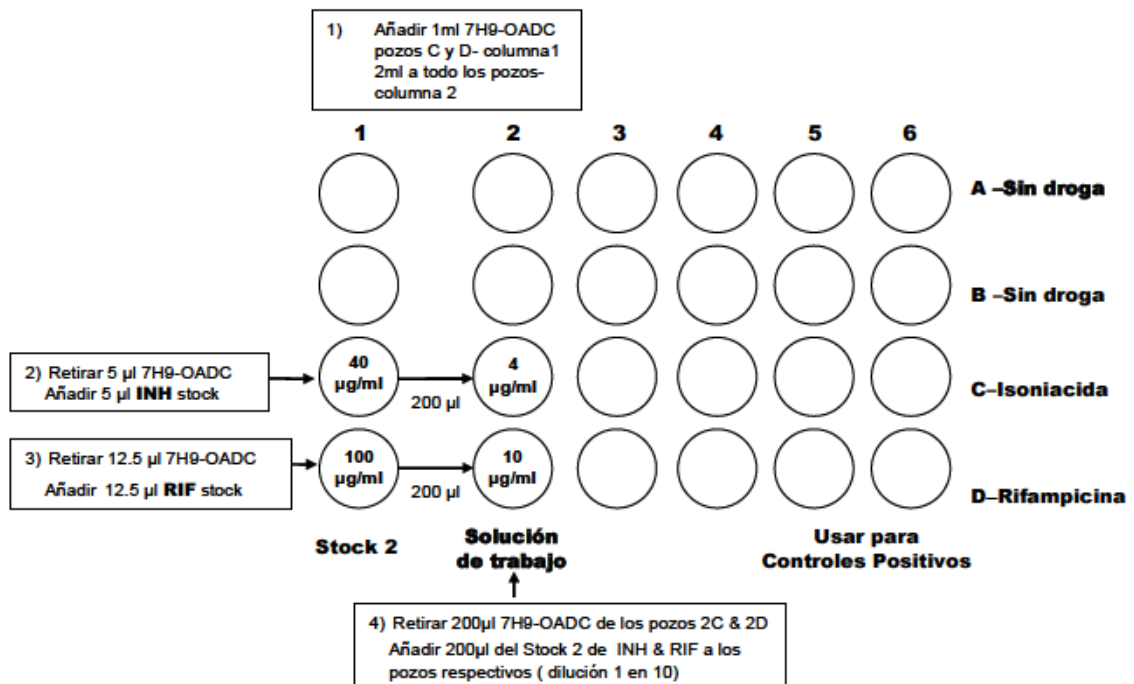
- Cada alícuota almacenada de 20µl es suficiente para 100 muestras.
- Cada alícuota congelada de 8 mg/ml de la solución stock de antibiótico es suficiente para 100 pozos de INH o RIF.
- Los volúmenes de 2mL de medio y la solución de trabajo de las drogas preparadas en la columna 2 son suficientes para 3 placas de MODS (que corresponde a 15 muestras de esputo más 3 controles negativos más 2 controles positivos)
- Si se van a procesar más 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, recordar incluir los controles negativos en cada placa, controles positivos y posibles pérdidas.
- No congele o re-use la solución stock y la solución de trabajo de la droga porque la actividad se puede perder. Descartar al final todo el resto de la solución stock sobrante.


	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

Dilución de la solución de trabajo de las drogas

Solución stock de drogas	Dilución del stock en 7H9-OADC para generar el stock 2	Dilución del stock 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 stock/995 µL 7H9-OADC (40 µg/ml)	1/10 4 µg/mL	INH	0,4
Rifampicina 8 mg/ml	12,5 µL stock/987,5 µL 7H9-OADC (100 µg/ml)	1/10 10 µg/mL	RIF	1,0

Desembolsar las placas estériles y rotular los cuadrantes de las placas con las abreviaturas de cada una de las drogas.



	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

ANEXO 06

PREPARACIÓN DE ESCALA ESTANDAR DE MCFARLAND 1.0

La preparación de la suspensión de bacterias ajustada a la escala Mac Farland N°1 deben 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 ATCC (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% 40µl
- Agua destilada estéril 10ml

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 crio preservación 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 10mL 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 100µL de la solución salina Tween 80.
- Asegurar fuertemente la tapa del tubo y mezclar en el agitador por 2-3 minutos; dejar reposar por 5 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 y 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. 3x10⁸ UFC/ml) con solución salina Tween 80.
- La suspensión bacteriana a escala 1,0 MacFarland se mantiene 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 puede ser: Repicados en una nueva placa Petri con agar 7H11 para mantener futuros repiques.
- Prepararlas para congelarlas por un largo periodo de tiempo.

Notas.-

Las cepas bien caracterizadas de MTB (una cepa sensible y cepas mono resistentes a INH y RIF) son usados como controles positivos, se emplean cada vez que se procesan muestras 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 que las muestras 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.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición N° 01

ANEXO 07 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 0.4µg/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.

+ 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

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición N° 01

ANEXO 08

CRIOCONSERVACIÓN DE LAS CEPAS DE LOS CULTIVOS MODS

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

Componentes

- Caldo base Middlebrook 7H9 0,94 g
- Glicerol 20 mL
- Agua destilada estéril 160 mL
- Suplemento ADC 20 mL
-


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 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

Criopreservación de cepas

1. Colocar en la cabina de bioseguridad biológica las placas Petri con agar 7H11 que contiene los subcultivos (cepas) obtenidas a partir de MODS.
2. Abrir la placa Petri con cuidado y coseche las colonias con una espátula estéril. Añadir la cepa a cada criovial conteniendo caldo 7H9 con 10% de glicerol.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición N° 01

ANEXO 09

PREPARACIÓN FINAL DEL MEDIO 7H9 Y SOLUCIÓN DESCONTAMINANTE

La preparación final de los medio 7H9 y solución de descontaminación se realiza el día del proceso de las muestras.


Componentes

Caldo 7H9 (dispensados en tubos conteniendo 4.5mL, 10.8mL)

OADC (suplemento nutricional)

PANTA (suplemento antimicrobiano)

- Disponer de 01 tubo con caldo 7H9 por cada muestra a procesar, 3 tubos para los controles positivos y un tubo para control negativo por placa.
- Disponer de 01 tubo con 10.8 mL de caldo 7H9 para realizar la dilución de drogas.
- Adicionar 0.5mL de OADC a cada tubo con 4.5 mL de 7H9, para obtener el OADC al 10% en el medio 7H9 (7H9-OADC: volumen total 5 mL).
- Adicionar 1.2 mL de OADC a los tubos con 10.8mL de 7H9-OADC: volumen total 12mL).
- Reconstituir el PANTA con 3mL de agua destilada estéril.
- Adicionar 100uL de PANTA a tubos con 5mL de 7H9-OADC para muestras y controles negativos excepto para controles positivos (estos no requieren PANTA). volumen total = 5.1mL.
- Disponer de tubos de polipropileno de 50mL con PBS, el volumen requerido de la solución buffer fosfato, de acuerdo al número de muestras a procesar.
- Disponer de tubos de polipropileno de 50 mL con la solución stock de NaOH-Citrato de sodio, para la descontaminación de las muestras de esputo, de acuerdo al número de muestras a procesar.
- Adicionar el NALC a la solución NaOH-Citrato y mover suavemente hasta que se disuelva.
- 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 antibióticos.

	MÉTODO DE ENSAYO	MET-CNSP-051
	SUSCEPTIBILIDAD A DROGAS MEDIANTE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA (MODS)	Edición Nº 01

ANEXO 10

DILUCIÓN DE DROGA PARA TRABAJO

La dilución de la droga se realiza el mismo día de proceso de muestras, para ello utilizamos caldo 7H9 suplementado con OADC.

- 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 dilución1) (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)