

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Laboratorio de Investigación y Desarrollo (LID)

Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas

Área de Mycobacterium



MODS

Guía del usuario

Microscopic observation drug susceptibility assay

Lima-Perú

2008

Contenido

1. Prólogo	3
2. Modificaciones sustanciales desde la última versión	3
3. Introducción.....	4
4. Bioseguridad – requerimientos mínimos.....	4
5. Equipos requeridos, suministros y reactivos	6
5.1. Equipos.....	6
5.2. Suministros	6
5.3. Reactivos	7
6. Soluciones stock.....	8
6.1. Buffer fosfato	8
6.2. Solución stock de NaOH – Citrato de Na (para la decontaminación del esputo	9
6.3. Medio líquido Middlebrook 7H9 con casitona y glicerol.....	9
6.4. OADC.....	10
6.5. PANTA	10
6.6. Soluciones stock de antibióticos	11
6.7. Cepas de TB para el control positivo	12
7. Método MODS– Preparación de las placas	14
7.1. Preparación final del medio 7H9-OADC y de 7H9-OADC-PANTA	16
7.2. Solución de trabajo de los antibióticos.....	17
7.3. Decontaminación de la muestra de esputo.....	19
7.4. Preparación final de las muestras y de las alícuotas stock.....	21
7.5. Preparación final de la placa de MODS	21
7.6. Preparación de las cepas control positivo - Control de Calidad Interno.....	22
8. Lectura de las placas	23
8.1. Detección de TB	23
8.2. Detección de la resistencia a drogas.....	25
8.3. Controles Internos	26
9. Eliminación de las placas	28
10. Aseguramiento de la calidad	28
11. Referencias.....	29
Anexo 1 – Posibles proveedores de reactivos y materiales consumibles	31
Anexo 2 – Calculando "g" y rpm según la longitud del rotor de la centrifuga.....	32
Anexo 3 – Método alternativo para la preparación de la solución de antibióticos	33
Anexo 4 – Preparación de la suspensión de la muestra y de las alícuotas stocks.....	35
Anexo 5 – Lectura e interpretación de los resultados	36
Anexo 6 – Recuperación y criopreservación de los cultivos MODS positivos	37

1. Prólogo

Esta guía describe cómo realizar en detalle el ensayo de susceptibilidad a fármacos mediante observación microscópica (MODS por sus siglas en inglés: Microscopic-Observation Drug-Susceptibility), desde la preparación de los reactivos y la decontaminación de los especímenes biológicos, hasta la detección del crecimiento micobacteriano y la interpretación de los resultados de la susceptibilidad directa a las drogas. Los anexos contienen información complementaria y procedimientos.

La versión actual (versión 12.2; Junio 2008) ha sido objeto de una amplia actualización y reformulación, para que la presente información sea lo más clara, completa y actualizada posible. Esperamos que esta guía pueda ser utilizada por los participantes en el curso "MODS: Ensayo de susceptibilidad a drogas por observación microscópica para el diagnóstico de tuberculosis y tuberculosis MDR directamente del esputo" y aquellos que implementen MODS de manera independiente.

Queremos dar las gracias al grupo del laboratorio de micobacterias y al personal del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, dirigido por el doctor Bob Gilman, quienes con su considerable experiencia han contribuido y sugerido las numerosas repeticiones que han conducido a la actual versión de la guía.

2. Modificaciones sustanciales desde la última versión

Esta versión reemplaza a la Versión 11 (Diciembre 2007). Las modificaciones sustanciales en el diseño y la descripción del procedimiento incluyen:

- Actualización de los equipos, materiales y reactivos requeridos.
- Revisión de la preparación del stock de antibióticos y solución de trabajo.
- Revisión de la preparación de los controles positivos con cepas de TB.
- Revisión de la preparación de la dilución de los antibióticos.
- Revisión de los procedimientos de decontaminación de la muestra y la preparación de las placas.
- Revisión de la lectura de placas y una completa y amplia interpretación de los resultados.
- Actualización de proveedores y números de catálogo de los suministros requeridos.
- Procedimientos para la recuperación y criopreservación de los cultivos positivos a MODS.

Esta versión también actualiza la versión 12 (Abril 2008), con algunas clarificaciones y pequeños cambios necesarios, identificados durante el entrenamiento.

- Sección 6.5 PANTA, los procedimientos de reconstitución ahora están más claros y detallados.

- Sección 6.7 ahora explícitamente describe la requerida concentración.
- Corrección de la concentración de NALC en la solución de decontaminación de 5% a 0.5%.
- Corrección del control interno negativo de 7H9-OADC a 7H9-OADC-PANTA (sección 7.5).
- Modificación del procedimiento de dispensación (7.5) para reducir la posibilidad de contaminación cruzada.

3. Introducción

MODS (Microscopic Observation Drug Susceptibility assay) se basa en un cultivo en medio líquido que detecta *Mycobacterium tuberculosis* y evalúa la susceptibilidad frente a isoniacida y rifampicina directamente de las muestras de esputo. El método se basa en dos propiedades importantes de *M. tuberculosis*: (1) El crecimiento es más rápido en medio líquido que en medio sólido y (2) su crecimiento característico en forma de cordón es fácilmente reconocible en el medio líquido usando un microscopio de luz invertida. Empleando un microscopio óptico de luz invertida y una placa de 24 pozos contenido muestras de esputo decontaminadas y resuspendidas en caldo Middlebrook 7H9 suplementado se puede examinar y detectar las microcolonias en un promedio de 7 días, y este es mucho más rápido que la detección del crecimiento macroscópico de las colonias en medio sólido. La incorporación de isoniacida 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 líquido frente al medio sólido para la detección de TB, la especificidad del 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 las mayores ventajas de este método.

4. Bioseguridad – requerimientos mínimos

Para realizar MODS de manera segura se requiere como mínimo un Nivel de Bioseguridad 2 (P2). Específicas medidas de bioseguridad son necesarias para trabajar en MODS, estas se dividen en dos categorías: Infraestructura adecuada y buenas prácticas de laboratorio. Aquí los elementos esenciales:

- Infraestructura
 - Cabina de bioseguridad de clase II en buen estado de mantenimiento, en el cual todo el aire que recircula pase a través del filtro HEPA.
 - Un ambiente de laboratorio que este separado del resto de laboratorios con ventanas bien selladas y puertas con cerradura para impedir el ingreso de personal y turbulencias de aire, mientras las muestras están siendo manipuladas.
 - Muebles sólidos que resistan el deterioro cuando se aplica el desinfectante.
- Prácticas de laboratorio
 - Personal entrenado en procesos de bioseguridad y su importancia en el laboratorio.
 - Empleo de protección adecuada (mandiles, guantes).

- Uso personal de adecuados protectores de respiración durante todo el tiempo del proceso (mascarilla N95).
- Adecuada manipulación y eliminación de la placa de MODS como abajo se describe.

Para detalles adicionales, consultar en:

- El website de MODS en: www.modsperu.org/Biosafety_FAQs.pdf
- CDC's "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (5^{ta} edition)
www.cdc.gov/OD/OHS/biosfty/bmbl5/bmbl5toc.htm
- WHO's "Laboratory services in tuberculosis control. Part III: Culture"
[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_\(part3\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_(part3).pdf)

5. Equipos requeridos, suministros y reactivos

5.1. Equipos

Balanza	para pesar isonicacida, rifampicina y NALC
Refrigeradora/congeladora	para almacenar el medio ya preparado & stocks de antibióticos
Autoclave	para esterilizar el medio, el buffer y las placas usadas
Vortex	para ayudar a la homogenización de la muestra
Centrifuga (no es necesario que sea refrigerada)	para la concentración del esputo (tubos de 15 ml con base cónica)
Incubadora (no es necesario el enriquecimiento con CO ₂)	para la incubación de los cultivos
Microscopio de luz invertida (objetivos 4x y 10x)	para la lectura de las placas de MODS
Micropipetas automáticas (1000µl,200µl,20µl)	para dispensar OADC, PANTA y antibióticos
Pipetas multicanal	para dispensar de manera rápida la solución de antibióticos

5.2. Suministros*

Tubos de vidrio (16x100 mm)	Para almacenar en alícuotas el medio de cultivo preparado
Filtros de 0.2µm (para solventes acuosos)	Para filtrar el stock de los antibióticos
Filtros de 0.2µm (para solventes orgánicos)	Para filtrar el stock de los antibióticos
Tubos de microcentrífuga	Para almacenar alícuotas del stock de antibióticos
Tubos de centrífuga de 15 ml de polipropileno (base cónica)	Para la decontaminación del esputo y su concentración
Tubos de 50 ml	Para alicuotar la solución decontaminante
Pipetas serológicas de 10 ml	Para alicuotar el 7H9 y dispensar el OADC
Pipetas Pasteur	Para mezclar el PANTA con el medio 7H9
Puntas de 200µl, 1000µl con y sin filtro	Para diluir los antibióticos, dispensar el medio 7H9
Jeringas de tuberculina (en caso de no tener micropipetas)	Para diluir los antibióticos, dispensar el medio 7H9
Placas de 24 pozos	Para el cultivo y lectura
Bolsas de polietileno tipo ziplock	Por bioseguridad, para contener la placa de 24 pozos

*todos los suministros deben estar estériles para su uso (con excepción de las bolsas de polietileno)

5.3. Reactivos

Caldo Middlebrook 7H9	Medio base para cultivo
Casitona (caseína pancreática digestiva)	Medio base para cultivo
Glicerol	Medio base para cultivo
PANTA	Suplemento antimicrobiano para el medio
OADC	Suplemento nutricional para el medio
Stock de antibióticos (INH-RIF)	Para evaluar la susceptibilidad directa
DMSO (Dimetil sulfoxido)	Para preparar el stock de rifampicina
Hidróxido de sodio en pastillas	Para la decontaminación del esputo
Citrato de sodio tribásico, di-hidratado	Para la decontaminación del esputo
N-acetyl- L-cisteína (NALC)	Para la decontaminación del esputo
Fosfato de sodio dibásico anhídrico (Na_2HPO_4)	Para la decontaminación del esputo
Fosfato de potasio monobásico en cristales (KH_2PO_4)	Para la decontaminación del esputo
Hipoclorito de sodio al 10%	Para descartar material contaminado
Desinfectante	Para desinfectar material contaminado o superficies

6. Soluciones stock

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.

6.1. Buffer fosfato - pH 6.8, 0.067M

- **Componentes**

Fosfato de sodio di-básico anhídrico	Na ₂ HPO ₄	9.47 g
Fosfato de potasio monobásico en cristales	KH ₂ PO ₄	9.07 g
Agua destilada		2000 ml

- **Preparación**

Solución A: Na₂HPO₄ (Fosfato de sodio dibásico)

Disolver 9.47g de fosfato de sodio dibásico en 1000ml de agua destilada

Solución B: KH₂PO₄ (Fosfato de potasio monobásico)

Disolver 9.07g de fosfato de potasio monobásico en 1000ml de agua destilada

6.1.1. Solución final del buffer fosfato (pH 6.8)

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

- **Procedimiento**

1. Mezclar 950ml de la solución A con 950ml de la solución B, separar 50ml de cada solución para ajustar el pH si fuera necesario.
2. Medir el pH – debe estar a pH 6.8 ± 0.2. Para ajustar:
 - Añadir la solución A para aumentar el pH.
 - Añadir la solución B para bajar el pH.
3. Esterilice en la autoclave a 121-124°C por 15 minutos.
4. Para confirmar la esterilidad de la solución buffer fosfato, colocar una alícuota de 100µl en un medio de agar nutritivo e incubar por 48 horas a 37°C
5. 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 puede alicuotar la cantidad necesaria de buffer el mismo día del proceso de las muestras, usando técnicas estériles.

6.2. Solución stock de NaOH – Citrato de Na (4% NaOH / 2.9% citrato de sodio para la decontaminación 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	400ml

- **Procedimiento**

1. Disolver 8.0g de hidróxido de sodio en 200ml de agua destilada
2. Disolver 5.8g de citrato de sodio en otros 200ml de agua destilada
3. Combinar las soluciones de hidróxido de sodio y citrato de sodio (en volúmenes iguales)
4. Mezclar y esterilizar en el autoclave a 121-124°C por 15 minutos
5. 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 (ver sección 7.3.1 “Solución de decontaminación NaOH-NALC”).

6.3. Medio líquido Middlebrook 7H9 con casitona y glicerol

(900ml - suficiente para 200 muestras)

- **Componentes**

Caldo base Middlebrook 7H9	5.9 g
Glicerol	3.1ml
Casitona	1.25 g
Agua destilada estéril	900ml

- **Procedimiento**

1. Disolver 5.9g del medio 7H9 en polvo en 900ml de agua destilada estéril conteniendo 3.1ml de glicerol y 1.25g de casitona.
2. Mezclar en constante agitación hasta que esté completamente disuelto (usar pastillas magnéticas en el mezclador si tuviera uno).
3. Esterilizar en la autoclave a 121-124°C por 15 minutos.
4. Enfriar y alicuotar 4.5ml del medio en tubos de vidrio estériles de 16x 100 mm para las muestras y alícuotas de 10.8ml para la preparación de las soluciones de antibióticos y para los controles internos

5. Incubar a 37°C por 48 horas para verificar la esterilidad (que se traduce como ausencia de turbidez)
6. 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 4.5ml de medio 7H9.

Cada tubo con 10.8ml de medio 7H9 es suficiente para preparar las soluciones de antibióticos y para los controles internos de 15 muestras de esputo. La cantidad a prepararse (ml) dependerá 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.

6.4. OADC

Suplemento de enriquecimiento del medio (con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa): la preparación comercial viene lista para su uso.

6.5. PANTA

Suplemento antimicrobiano usado para minimizar la contaminación de los cultivos de MODS que puede ser causado por la flora oral de microorganismos no eliminados durante el proceso de decontaminación. El frasco de PANTA BBL MGIT contiene una mezcla liofilizada de agentes antimicrobianos.

Reconstituir el contenido liofilizado del frasco PANTA BBL MGIT con 3 ml de agua destilada estéril.

Antibiótico	Formulación por frasco	Concentración por ml después de reconstituir con 3ml de agua destilada estéril	Concentración final en el pozo con la muestra en medio 7H9-OADC
Polimixina B	6000U	2000 U/ml	40 U/ml
Amfotericina B	600µg	200 µg/ml	4µg/ml
Acido Nalidixico	2,400µg	800 µg/ml	16µg/ml
Trimetroprim	600µg	200 µg/ml	4µg/ml
Azlocilina	600µg	200 µg/ml	4µg/ml

6.6. Soluciones stock de antibióticos

6.6.1. Stock de Isoniacida (8 mg/ml)

- **Componentes**

Isoniacida	20 mg
Agua destilada estéril	2.5 ml

- **Procedimiento**

1. Disolver completamente 20 mg de isoniacida en 2.5ml de agua destilada estéril
2. Filtrar empleando un filtro de jeringa de 0.2µm para **solventes acuosos**
3. Almacenar en alícuotas de 20µl en tubos estériles de microcentrífuga a -20°C hasta por 6 meses.

- **Nota**

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

6.6.2. Stock de Rifampicina (8 mg/ml)

- **Componentes**

Rifampicina	20 mg
Dimetil sulfoxido (DMSO)	1.25 ml
Agua destilada estéril	1.25 ml

- **Procedimiento**

1. Disolver completamente 20 mg de rifampicina en 1.25ml de DMSO.
2. Añadir 1.25ml de agua destilada estéril y mezclar.
3. Filtrar empleando un filtro de jeringa de 0.2µm para **solventes orgánicos**
4. Almacenar en alícuotas de 20µl en tubos estériles de microcentrífuga a -20°C hasta por 6 meses.

- **Nota**

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

6.7. Cepas de TB para el control positivo

Las cepas bien caracterizadas de *M. tuberculosis* (una cepa sensible y una cepa MDR) son usados 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.

- **Requisitos**

Cepa H37Rv de *M. tuberculosis* ATCC 27294 - (control sensible)

Cepa MDR (cepa local DM97 es usada en UPCH)

Agar Middlebrook 7H11-5% OADC en placas Petri

Solución estéril de Tween 80 al 10% 40µl

Agua destilada estéril 10ml

- **Procedimiento**

1. Reconstituir con la solución acompañante la cepa control comercialmente preparada
2. Colocar la solución de la cepa en una placa Petri conteniendo agar Middlebrook 7H11 (ver [Anexo 6, "Recuperación & criopreservación de cultivos positivos de MODS"](#)).
3. Incubar a 37°C por 15-20 días.
4. El mismo día de la preparación de la solución 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 %)
5. Utilizando un asa de siembra estéril, coger varias colonias de micobacterias y colocarlas en un tubo estéril con perlas de vidrio (beads) que contenga 100µl de la solución agua-tween
6. Asegurar fuertemente la tapa del tubo y mezclar en el agitador por 2-3 minutos; dejar reposar por 5 minutos.
7. Abrir el tubo y añadir 3ml de la solución agua-tween, asegurar bien la tapa del tubo y mezclar en el agitador por 20 segundos.
8. Dejar reposar por 30 minutos.
9. Transferir el sobrenadante a otro tubo estéril empleando una pipeta de transferencia.
10. Ajustar la turbidez a la escala 1 de MacFarland (aprox. 3×10^8 CFU/ml) con solución agua-tween.
11. La suspensión de bacterias a escala 1 de MacFarland se mantiene bien sellada y refrigerada a 2-8°C para ser empleada posteriormente por un periodo no mayor a 15 días.
12. 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 (ver [Anexo 6](#))

- **Notas**

La preparación de la suspensión de bacterias a la escala 1 de MacFarland involucra manipulación de concentradas suspensiones micobacterianas y deben llevarse a cabo solo en cabinas de bioseguridad

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 MDR o mono resistente a rifampicina e isoniacida) empleando el procedimiento descrito en el [Anexo 6](#). Si se prefiere, una cepa MDR puede ser reemplazada con dos cepas mono resistentes: Una cepa resistente a isoniacida/sensible a rifampicina y otra cepa resistente a rifampicina/sensible a isoniacida.

7. Método MODS – Preparación de las placas

Resumen de los pasos a seguir en el día del procesamiento de las muestras clínicas

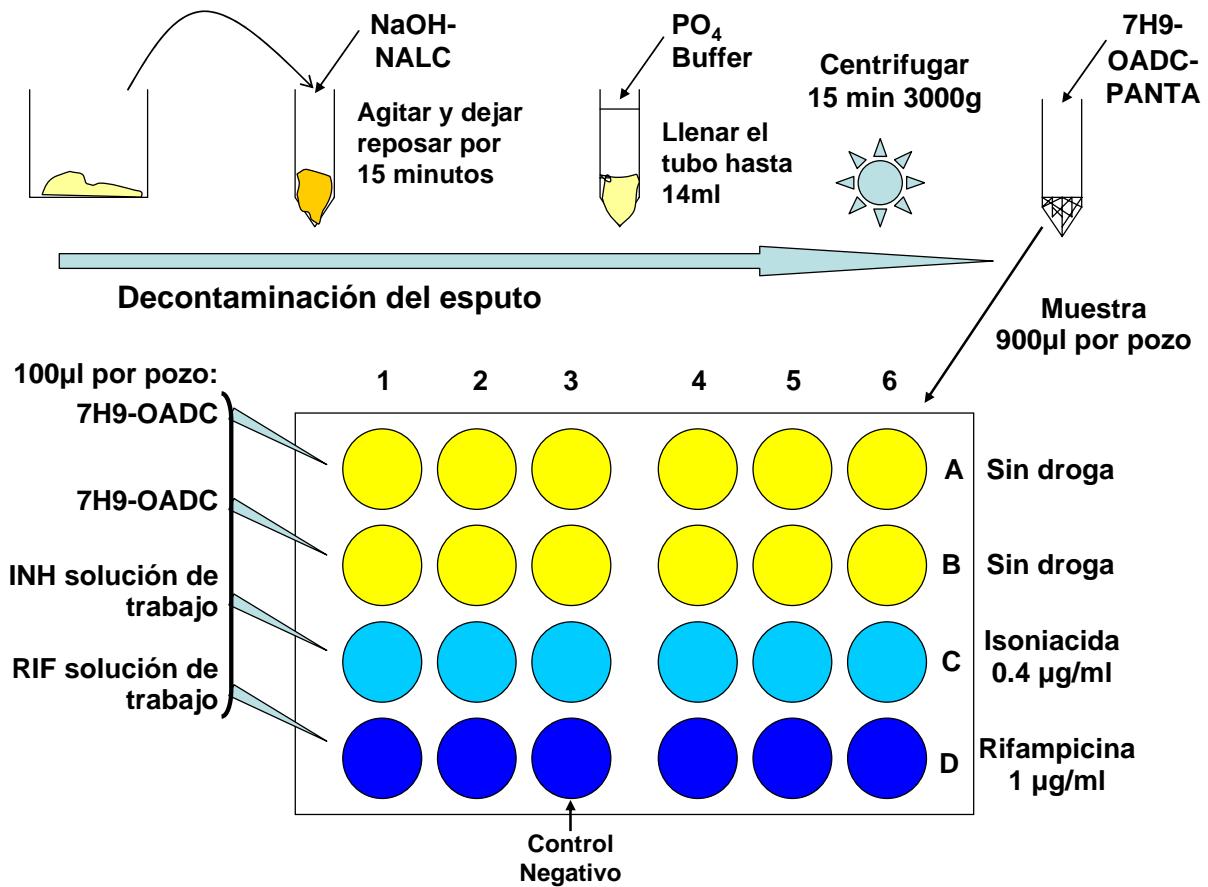
En un área limpia (o en la cabina de bioseguridad antes de colocar las muestras), empleando procedimientos estériles:

1. Añadir OADC al medio 7H9 (**7H9-OADC**).
2. Reconstituir el PANTA y añadirlo a los tubos con 7H9-OADC (**7H9-OADC-PANTA**).
3. Preparar la solución de trabajo de los antibióticos en la placa de 24 pozos.
4. Dispensar los volúmenes requeridos del stock de NaOH-citrato de Na y buffer fosfato (si se ha almacenado frascos con grandes volúmenes)
5. Pesar la cantidad necesaria de NALC que se va a añadir a la solución NaOH- citrato de Na.

En la cabina de bioseguridad empleada para el proceso de las muestras de TB:

1. Preparar las muestras para la decontaminación y seguir el protocolo de decontaminación.
2. Resuspender el concentrado (sedimento) de las muestras con 7H9-OADC-PANTA.
3. Añadir la solución de trabajo de los antibióticos a los pocillos de la placa de 24 pozos.
4. Seguir el procedimiento para dispensar las muestras en la placa y guardar los alícuotas stocks.
5. Cerrar la placa con su tapa y colocarla en una bolsa tipo ziplock, luego ubicarlo en la incubadora.
6. Dispensar los controles positivos en los pocillos no utilizados de la placa donde se preparó la solución de trabajo de antibióticos. Cerrar la placa y colocarla en una bolsa tipo ziplock, luego ubicarlo en la incubadora a 37°C.
7. Empezar con la lectura de las placas desde el día 5 de su incubación.

Figura 1. Flujograma del ensayo de MODS:



7.1. Preparación final del medio 7H9-OADC y de 7H9-OADC-PANTA

La preparación final de los medios solo se realiza el mismo día del proceso de las muestras.

- **Componentes**

[Medio 7H9](#) (dispensados en tubos conteniendo 4.5ml, 10.8ml)

[OADC](#)

[PANTA](#)

- **Procedimiento**

1. Preparar:

- a. 1 tubo con medio 7H9 para cada muestra de esputo, más un tubo adicional para cada placa (el cual es empleado para el control negativo), mas
 - b. 2 tubos con medio 7H9 para los controles positivos (3 si se emplean cepas mono-resistentes), mas
 - c. 1-2 tubos con 10.8ml de 7H9 para preparar la solución de antibióticos.
2. Añadir 0.5ml de OADC a cada tubo con 4.5ml de 7H9, para obtener el OADC al 10% en el medio 7H9 (**7H9-OADC**: volumen total = 5ml).
 3. Añadir 1.2ml de OADC a los tubos con 10.8ml 7H9 (**7H9-OADC**: volumen total = 12ml).
 4. Separar 2 tubos con 5ml de 7H9-OADC para los controles positivos y tubos con 12ml de 7H9-OADC para preparar la solución de antibióticos (estos no requieren PANTA).
 5. Reconstituir el PANTA y añadir 0.1ml a cada tubo designado para la muestra y a los tubos designados como controles negativos (**7H9-OADC-PANTA**: volumen total = 5.1ml).

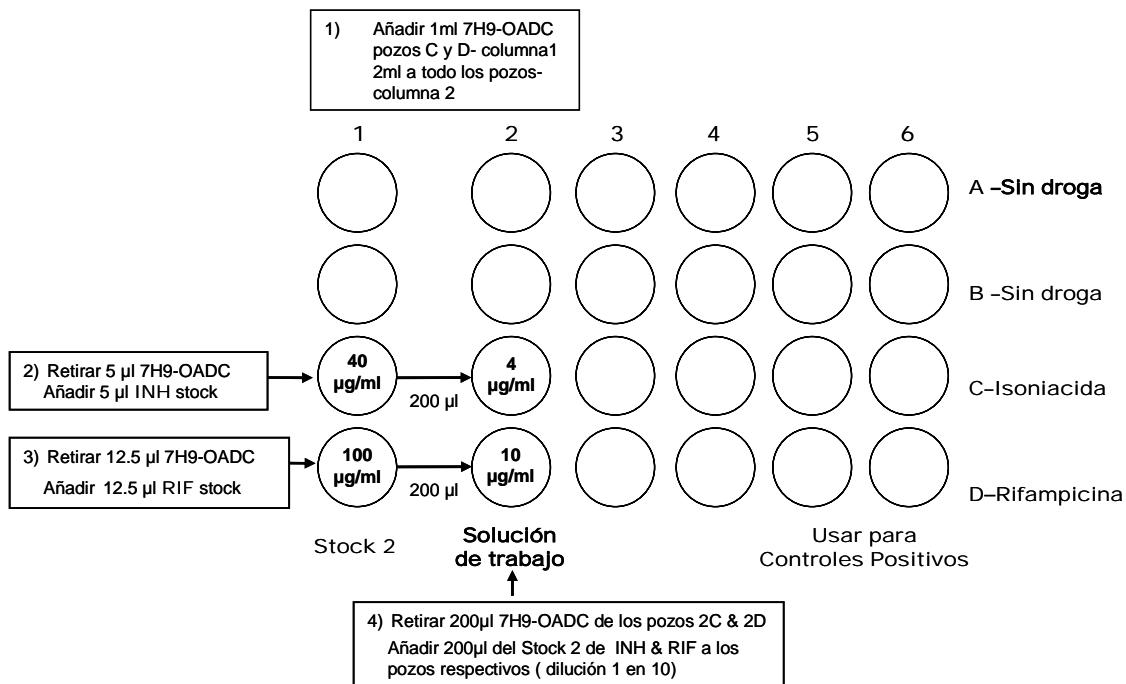
- **Nota**

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.

7.2. Solución de trabajo de los antibióticos

Para obtener los resultados exactos de la susceptibilidad la concentración final de los antibióticos es crítico. El siguiente procedimiento es adecuado para los laboratorios equipados con micropipetas, si las micropipetas no están disponibles, se pueden emplear jeringas de tuberculina según lo descrito en el [Anexo 3, “Métodos alternativos para la preparación de la solución de antibióticos”](#).

Las soluciones de trabajo de cada antibiótico son preparadas el mismo día que se emplea las alícuotas almacenadas de las soluciones stock de 8 mg/ml. Las diluciones intermedias de los antibióticos se realizan en una placa de 24 pozos (Figura 2) las columnas no utilizadas de esa placa pueden ser empleadas después para los controles positivos.



7.2.1. Preparación de la placa de 24 pozos para la dilución de antibióticos (Figura – paso 1):

1. Añadir 1ml de 7H9-OADC a los pozos 1C y 1D.
2. Añadir 2ml de 7H9-OADC a todos los 4 pozos en la columna 2 (pozos 2A, 2B, 2C, 2D) (esto es suficiente para 15 muestras de esputo más 3 controles negativos y 2 controles positivos).

7.2.2. Preparación de la solución del stock 2 (Figura – paso 2 & 3):

1. Descongelar una alícuota de ambas soluciones stock de antibióticos de 8 mg/ml
2. Empleando una micropipeta, retirar 5 μ l del medio del pozo correspondiente a INH (1C) y luego añadir 5 μ l del la solución stock de INH; mezclar bien (**0.04 mg/ml=40 μ g/ml INH stock 2**).
3. Empleando una micropipeta, retirar 12.5 μ l del medio del pozo correspondiente a rifampicina (1D) y luego añadir 12.5 μ l del stock de RIF; mezclar bien (**0.1 mg/ml =100 μ g/ml RIF stock 2**).

7.2.3. Preparación de la solución de trabajo (Figura – paso 4):

1. Empleando una micropipeta, retirar 200 μ l de los pozos 2C y 2D -
2. Añadir 200 μ l del stock 2 de INH al pozo 2C; mezclar bien (**4 μ g/ml INH solución de trabajo**).
3. Añadir 200 μ l del stock 2 de RIF al pozo 2D; mezclar bien (**10 μ g/ml RIF solución de trabajo**).
4. Los pozos en la columna 2 contienen ahora las soluciones que van a ser añadidas a la suspensión de las muestras ya decontaminadas – ver [“Preparación Final de la placa de MODS”](#), (sección 7.5).

- **Notas**

Cada alícuota congelada de 8 mg/ml de la solución stock de antibiótico es suficiente para 100 pozos de isoniacida o rifampicina.

Los volúmenes de 2ml de medio y la solución de trabajo de los antibióticos preparados en la columna 2 son suficientes para 3 placas de MODS (que corresponde a 15 muestras de esputo más 3 controles negativos mas 2 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 2ml 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 re-use 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.

Tabla 1. Dilución de la solución de trabajo de los antibióticos

Solución stock de antibióticos	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

7.3. Decontaminación de la muestra de esputo

La decontaminación del esputo se realiza por el método del **hidróxido de Sodio-N-acetil-L-cisteína (NaOH-NALC)** descrito en “Public Health Mycobacteriology: A guide for the Level III Laboratory. 1985”. NALC es un agente mucolítico; y este se debe añadir a la solución estéril de NaOH - Citrato de Na en el día que se va a usar, ya que su actividad disminuye si se conserva de esa manera. El citrato de sodio en la solución de NaOH previene que los iones de los metales pesados, que podrían estar presentes en la muestra, desactiven el NALC.

7.3.1. Solución de decontaminación NaOH-NALC

Cada muestra de esputo requiere 2ml de la solución de decontaminación.

- Componentes**

Solución stock de NaOH-citrato de Na
N-acetil-L-cisteína (NALC)

} Ver tabla 2 para las cantidades

- Procedimiento**

Disolver 0.1g de los cristales de NALC por cada 20ml de la solución de decontaminación (0.5% de NALC en NaOH-citrato de Na= Solución de decontaminación **NaOH-NALC**)

Tabla 2. Preparación de la solución de decontaminación

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

- **Nota**

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

7.3.2. Procedimiento de decontaminación

1. Colocar 2ml de la muestra de esputo en un tubo de centrifuga de 15ml.
(Si el volumen es menor a 2ml completar a ese volumen con buffer fosfato; si es mayor emplear solo 2ml)
2. Añadir 2ml de la solución NaOH-NALC.
3. 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.
4. Dejar reposar por un mínimo de 15 minutos – puede prologarse por unos minutos más si la muestra es demasiado mucoide. Evitar el tiempo de sobreexposición, **este no debe exceder de 20 minutos.**
5. Llenar el tubo hasta un volumen de 14ml con buffer fosfato (pH 6.8), para neutralizar la reacción alcalina y terminar con el proceso de decontaminación, mezclar bien invirtiendo el tubo por 4 veces.
6. Centrifugar a 3000 g por 15 minutos.
7. Descartar cuidadosamente el sobrenadante en un recipiente que contenga hipoclorito de sodio al 10% u otro desinfectante apropiado, mantener el sedimento de la muestra.

- **Notas**

La actividad mucolítica del NALC se puede ver reducida por una excesiva agitación. Por lo cual se debe evitar una prolongada agitación o mezclar de manera vigorosa la solución de decontaminación NaOH-NALC.

La fuerza *g* de la centrifuga varía de acuerdo a la longitud del rotor de la centrifuga; los diferentes modelos de centrifuga requieren diferentes velocidades de rpm para llegar a las recomendadas 3000g. Ver [Anexo 2](#) para realizar el cálculo de rpm requerido para obtener 3000g en base a la longitud del rotor.

Un excesivo tiempo de decontaminación resultaría en la eliminación de los bacilos micobacterianos. Si los rangos de contaminación del cultivo de MODS son menores al 2%, o las muestras que se esperaban fueran positivas no presentan crecimiento, se puede pensar en la posibilidad de un exceso de decontaminación de la muestra.

7.4. Preparación final de las muestras y de las alícuotas stock (ver [Anexo 4](#))

- **Procedimiento**

1. Empleando una pipeta Pasteur resuspender el concentrado de la muestra en un volumen total de 2ml del medio 7H9-OADC-PANTA (del tubo que contiene los 5.1ml), en el tubo de centrifuga. Homogenizar bien la suspensión evitando formar burbujas de aire.
2. De esta suspensión de la muestra retirar 1ml y almacenarlo en un tubo estéril de microcentrífuga de 2-8°C como backup
3. 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.

7.5. Preparación final de la placa de MODS

- **Procedimiento**

1. Empleando una pipeta multicanal llenar cuidadosamente 4 puntas con 100µl del medio 7H9-OADC y con la solución de trabajo de antibióticos (Columna 2 de la placa de la dilución de antibióticos).
2. Añadir estos 100µl a los pocillos de la columna 1 (en la placa designada para las muestras).
3. Repetir el mismo procedimiento hasta que todas las columnas contengan los 100µl de medio 7H9-OADC (pozos sin droga) o la solución de trabajo de antibióticos (incluyendo el control negativo de la columna 3).
4. Dispensar 900µl de la suspensión final de la muestra a cada uno de los 4 pozos de una columna en la placa de 24 pozos.
5. Repetir el mismo procedimiento con las otras muestras hasta que la placa este llena con excepción de la columna 3 (o hasta que todas las muestras hayan sido dispensadas).
6. Dispensar 900µl del medio 7H9-OADC-PANTA **sin muestra** en los 4 pozos de la columna 3 de cada placa de MODS (controles internos negativos).
7. Cerrar la placa con su tapa, colocarla en una bolsa de polietileno tipo ziplock y cerrarla. **(la bolsa no se abrirá de ahora en adelante).**
8. Incubar a 37°C (No es necesario el enriquecimiento con CO₂)

- **Nota**

Ver arriba la figura 1 para el diseño (Flujograma del ensayo de MODS)

7.6. Preparación de las cepas control positivo - Control de Calidad Interno

Cada día que se procesen las muestras, deben procesarse también dos cepas control positivo, una cepa sensible a todas las drogas y otra cepa MDR. Si los laboratorios prefieren evitar el uso de cepas MDR, pueden utilizar una cepa monoresistente a isoniacida y una cepa monoresistente a rifampicina. Los controles positivos nos permiten evaluar la calidad del medio de cultivo y los antibióticos empleados el mismo día del proceso. Si no se observa crecimiento con los patrones esperados en los controles positivos, los resultados de las muestras procesadas en ese día **no son válidos**. Ver sección 8.3 -Controles Internos

Para minimizar el riesgo de contaminación cruzada, los controles positivos son preparados y dispensados en una placa diferente, este proceso se realiza después de que las muestras del día hayan sido dispensadas, colocadas en las bolsas tipo ziplock, y ubicadas en la incubadora. Los pocillos no utilizados, de la placa donde se preparó la solución de antibióticos, pueden ser empleados para este propósito.

- **Procedimiento**

1. Mezclar 5 μ l de cada suspensión de cepas ajustada a la escala 1 de MacFarland con 5ml del medio 7H9-OADC.
2. Empleando una pipeta multicanal, adicionar a los 4 pozos los 100 μ l de caldo 7H9-OADC y la solución de trabajo de antibióticos, así como se hizo para las muestras.
3. Alicuotar 900 μ l de cada suspensión de cepas en los 4 pozos de una columna en la placa separada para los controles positivos.
4. Cubrir la placa con su tapa y colocarla en la bolsa tipo ziplock sellar; e incubar a 37°C junto a las otras placas procesadas el mismo día.

8. Lectura de las placas ¹

8.1. Detección de TB

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. Ver tabla 3 y [Anexo 5](#) para mas detalles en la interpretación de los resultados

- **Procedimiento**

1. Las placas son retiradas de la incubadora para su observación en el microscopio invertido.
2. Las placas son examinadas bajo el microscopio de luz invertida con las bolsas selladas, las cuales **no son abiertas**.
3. La lectura de las placas se inicia por los pocillos sin antibióticos en el día 5 de incubación. En sus inicios (días 5-9) el crecimiento de MTB parecen como pequeñas curvas comas o espirales.

La formación de las colonias por lo general progres a la formación de cordones y luego a un crecimiento irregular más enmarañado.

Si crecen dos o más unidades formadoras de colonias (≥ 2 ufc) en cada uno de los pozos sin antibióticos, el resultado es determinado como cultivo positivo.

4. Si los resultados son negativos en el día 5, se debe continuar con la lectura diaria de los pozos sin antibióticos (o interdiario de acuerdo con la carga de trabajo del laboratorio) hasta que ≥ 2 ufc sean observados en cada pozo.
5. Cuando se observa un resultado positivo, se procede a realizar la lectura de los pozos con isoniacida y rifampicina el mismo día, ver abajo la sección “Detección de la resistencia a drogas”.
6. Si no se observa crecimiento hasta el día 15, se debe continuar la lectura hasta el día 18 y luego el día 21. Si para ese día el resultado continúa siendo negativo, el resultado final será determinado como cultivo negativo.
7. Si solo se reporta crecimiento de 1 ufc en algún pozo sin droga, o en ambos, el resultado será “indeterminado”.
8. No se debería leer los pozos con droga, si la lectura en los pozos sin droga es negativo o indeterminado. (Ver. sección [8.2](#)).
9. Si los pozos se contaminaran con bacterias u hongos, se deben re-decontaminar y reprocesar las alícuotas que se guardaron o pedir una nueva muestra, si la contaminación está presente los resultados no pueden ser interpretados.

¹ Ver la galería fotográfica en www.modsperu.org

Antes de considerar a los resultados finales como validos, los controles internos negativo y positivo deben ser examinados e interpretados Ver sección 8.3 "Controles Internos".

- **Notas**

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 de MTB. 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 es aparente en el día 5 con un aspecto turbio y con crecimiento abundante. Si se produce la contaminación se deben re-decontaminar y reprocesar las alícuotas de la muestra que se guardaron o solicitar una nueva muestra al paciente (ver [Anexo 4](#)).

Los medios de cultivo **no deben tener un aspecto turbio** con el crecimiento micobacteriano (MTB).

Los desechos acompañantes en la muestra pueden dificultar la detección temprana de micobacterias, pero con el tiempo, las colonias micobacterianas más maduras pueden ser detectadas sobre todo en la periferia de los pozos.

El crecimiento en un sólo 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 conducirán a obtener resultados más rápidos.

Tabla 3. Lectura e interpretación de los pozos libres de drogas:

Leyenda:

Observación de un pozo sin droga (A o B)	Interpretación de los hallazgos en los pozos
≥ 2 unidades formadoras de colonia (ufc)	Positivo
no crecimiento (0 ufc)	Negativo
Crecimiento de 1 ufc	Indeterminado
Sobrecrecimiento de bacterias /hongos	Contaminado

Interpretación:

Combinando los hallazgos en ambos pozos (A & 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

8.2. Detección de la resistencia a drogas

Los pozos con antibióticos sólo deben examinarse cuando los pozos sin droga son positivos (≥ 2 ufc).

La resistencia es definida como el crecimiento micobacteriano de ≥ 2 ufc en los pozos con drogas el mismo día en que ambos pozos sin drogas son positivos. Ver la tabla 4 y el [Anexo 5](#) para mayor detalle en la interpretación de los resultados.

- **Procedimiento**

1. El mismo día en que ambos pozos sin drogas presentan crecimiento micobacteriano de ≥ 2 ufc, se examinan los pozos con isoniacida y rifampicina.
2. Si hubiese crecimiento en un pozo que contiene la droga, la muestra es resistente a esa droga (a la específica concentración); si no hay crecimiento significa que la muestra es sensible a esa droga.
3. Si existe crecimiento en ambos pozos conteniendo isoniacida y rifampicina, la muestra es considerada multidrogoresistente (MDR).
4. Los pozos con droga NO deben volver a examinarse después del día de que los pozos sin drogas hayan sido identificados claramente como positivos. Después de una incubación prolongada, el escaso progreso en el crecimiento en los pozos con drogas no es indicativo de resistencia.

- **Notas**

El crecimiento de *M. tuberculosis* resistente en los pozos que contienen drogas suele ser fácilmente identificable cuando los pozos sin drogas son positivos.

La cantidad de crecimiento puede ser menos en los pozos con droga, pero la presencia de cualquier crecimiento (≥ 2 ufc) indica resistencia (este no es un test de proporción).

Sólo en muy raras ocasiones es detectado una sola ufc en los pozos que contienen drogas (hay que leer en el tiempo correcto), sin embargo si esto ocurriera la interpretación es indeterminada.

El crecimiento en los pozos que contienen drogas solo debería ser considerado como indicativo de resistencia siempre que los pozos libres de droga también muestren crecimiento.

Tabla 4. Lectura e interpretación de los pozos que contienen isoniacida y rifampicina

Leyenda:

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

Interpretación:

Combinando los hallazgos en ambos pozos (C & D)	Interpretación total de la susceptibilidad las a las drogas.
No hay crecimiento en ninguno de los pozos conteniendo drogas.	Sensible (no es MDR)
Crecimiento solo en el pozo con isoniacida	Resistente a isoniacida (no es MDR)
Crecimiento solo en el pozo con rifampicina	Resistente a rifampicina (no es MDR)
Crecimiento en ambos pozos con drogas	Multidrogoresistente (MDR)
Crecimiento de 1 ufc en cualquier pozo con droga	Indeterminado para esa droga
Cualquiera de los pozos con drogas contaminado	Indeterminado para esa droga

8.3. Controles Internos

El uso de controles internos negativos (en cada placa con las muestras) y controles positivos (que se realizan cada día que se procesan las muestras) son esenciales para garantizar los resultados válidos de MODS. Los controles internos deben ser examinados e interpretados correctamente antes de que los resultados de las muestras puedan ser considerados válidos. Véase la Tabla 5.

Los pozos de los controles internos son leídos e interpretados de la misma manera que los pozos con muestra.

8.3.1. Controles negativos

Estos son los pozos con medio de cultivo, pero sin muestra los cuales se ejecutan en cada placa.

Todos los 4 pozos en la columna 3 (3A, 3B, 3C y 3D) no deberían tener crecimiento.

Si alguna colonia de micobacteria es observada en cualquiera de esos pozos, se ha producido contaminación cruzada. Toda las placas deben ser desecharadas; reprocesar las alícuotas guardadas si se dispone de ellas, o solicitar nuevas muestras. Se debe realizar una búsqueda de posibles fuentes de contaminación cruzada si las fuentes son identificadas deben adoptarse medidas correctivas adecuadas.

8.3.2. Controles positivos de *M. tuberculosis*

Estos son los controles positivos (sensible y resistente) que se trabajan en una placa aparte cada día que se procesan las muestras.

8.3.2.1. Pozos libres de antibióticos

Los 4 pozos sin drogas (dos corresponden a la cepa sensible y dos a la cepa MDR) deben de tener un crecimiento de micobacterias ≥ 2 ufc.

La ausencia de crecimiento en estos pozos libres de droga, puede sugerir que el medio de cultivo no favoreció al crecimiento. El proceso de muestras de ese día no sería valido por tanto todas las muestras procesadas en el día deben ser reprocesadas con un nuevo lote de medio líquido.

Si solo uno de los controles positivos crece en los pozos control libre de drogas, el control positivo que no creció puede que no sea viable; una nueva y fresca suspensión bacteriana debería ser usada para re- evaluar la susceptibilidad.

8.3.2.2. Pozos con antibióticos

Así como en las muestras de esputo, solo se deben leer los pozos con antibióticos si los pozos libre de antibióticos son positivos.

El control sensible (cepa H37Rv u otra) no debe crecer en ninguno de los pozos conteniendo antibióticos. Un crecimiento indicaría una incorrecta (baja), concentración del antibiótico o una inadecuada actividad de la isoniacida y/o la rifampicina.

La cepa control resistente a los antibióticos (1 cepa MDR, o 2 cepas mono- resistentes) deben crecer en los pozos que contienen los antibióticos. La ausencia de crecimiento indica que las concentraciones finales de isoniacida y / o rifampicina son demasiado elevadas.

Si los controles positivos no funcionan como se espera en los pozos con antibióticos, los resultados de susceptibilidad para las muestras procesadas el mismo día **no son válidos** (indeterminado) - descartar todas las placas y reprocesar las muestras de las alícuotas guardadas o procesar nuevas muestras de esputo utilizando un nuevo stock de antibióticos y nuevas soluciones de trabajo.

• Notas

La ausencia de crecimiento de la cepa control en todos los pozos sin antibióticos, también puede indicar la no-viabilidad de la cepa. Considerar la preparación de nuevas cepas control para volver a evaluar la susceptibilidad.

La reducción de la actividad de los antibióticos puede ser debido a incorrectas concentraciones, o la reducción de su potencia relacionada con una inadecuada manipulación o almacenamiento del stock original (antibióticos en polvo) o de la solución stock de antibióticos.

Tabla 5. Resultados esperados de los controles internos

Tipo de control	Cepa	Medio	Resultados esperados
Negativo	Ninguno	4 pozos por columna (2 libres de droga, 1-INH, 1-RIF)	No hay crecimiento
Positivo	Completamente Sensible	Pozos libres de drogas Pozos que contienen INH y RIF	Crecimiento No hay crecimiento
	MDR*	Pozos libres de drogas Pozos que contienen INH y RIF	Crecimiento Crecimiento

*Pueden ser cepas monoresistentes a INH- & RIF

9. Eliminación de las placas

- **Procedimiento**
 1. Mantener todas las placas en sus respectivas bolsas ziplock, colocarlas en bolsas de autoclave y sellar la bolsa.
 2. Esterilizar en la autoclave a 121-124°C durante 45-60 minutos.
 3. 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.

10. Aseguramiento de la calidad

La metodología de MODS, descrita en esta guía, incluye controles de esterilidad para las soluciones stock y los medios. Corrida de los controles internos positivos, para evaluar el medio, y el funcionamiento de la solución de antibióticos. Corrida de los controles internos negativos para la evaluación de contaminación cruzada.

Un sistemático plan de aseguramiento de la calidad (AC) incluyendo el control de calidad (CC) y una evaluación externa de la calidad (EEC) de los procedimientos están en proceso de evaluación, los cuales serán añadidos cuando estos sean validados. Un anteproyecto de ello esta disponible en www.modsperu.org. Cualquier sugerencia y aporte es bienvenido.

11. Referencias

11.1 MODS

www.modsperu.org

Ejigu GS, Woldeamanuel Y, Shah NS et al.

Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB.

Int J Tuber Lung Dis 2008; 12(3):332-337.

Tovar M, Siedner MJ, Gilman RH et al.

Improved diagnosis of pleural tuberculosis using the microscopic observation drug susceptibility technique

Clin Infect Dis 2008; 46: 909-12

Caws M, Ha MDT, Torok E et al.

Evaluation of the MODS culture technique for the diagnosis of tuberculous meningitis.

PLoS ONE 2007; 11: e1173

Moore DAJ, Roper MH

Diagnosis of smear-negative tuberculosis in people with HIV/AIDS.

Lancet 2007; 370: 1033

Moore DAJ.

Future prospects for the MODS assay in multidrug resistant tuberculosis diagnosis.

Future Microbiol 2007; 2: 97-101

Caviedes L, Moore DAJ.

Introducing MODS – a low-cost, low-tech tool for high-performance detection of tuberculosis and multidrug resistant tuberculosis.

Ind J Med Micro 2007; 25 (2): 87-8

Mello FCQ, Arias MS, Rosales S et al.

Clinical evaluation of the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay for detection of *Mycobacterium* tuberculosis resistant to isoniazid or rifampicin.

J Clin Microbiol 2007; 45 (10): 3387-9

Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M et al.

Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium* tuberculosis.

J Clin Microbiol 2007; 45 (4): 1093-1097

Arias M, Mello FCQ, Pavón A et. al

Clinical evaluation of the microscopic observation drug susceptibility assay for detection of tuberculosis.

Clin Infect Dis 2007; 44: 674-80

Moore DAJ, Gilman RH, Friedland JS.

MODS assay for the diagnosis of TB.

N Engl J Med 2007; 356 (2): 189

Moore DAJ, Evans CA, Gilman RH et. al.

Microscopic-Observation Drug-Susceptibility Assay for the Diagnosis of TB.

N Engl J Med 2006; 355: 1539-50

Moore DAJ, Caviedes L, Coronel J et. al.

Low rates of *Mycobacterium tuberculosis* liquid culture cross-contamination in the microscopic observation drug susceptibility assay (MODS).

Diagn Micro Infect Dis 2006; 56: 35-43

Oberhelman RA, Soto-Castellares G, Caviedes et al.

Improved recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from children using the microscopic observation drug susceptibility method.

Pediatrics 2006; 118 (1): 100-106

Moore DAJ, Mendoza D, Gilman RH et al,

Microscopic observation drug susceptibility assay – a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings.

J Clin Microbiol 2004; 42 (10): 4432-7

Caviedes L, Lee TS, Gilman RH et al.

Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru.

J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1203-8.

11.2. Bioseguridad y métodos de laboratorio

CDC

- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) 5th Edition.
<http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbi5/bmbi5toc.htm>
- Kent, B.D. and Kubica, G.P. Public health mycobacteriology.
A guide for the level III laboratory 1985 p.36-39, 47-69, and 185-187. US. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.

WHO

- Laboratory Services in Tuberculosis Control Series (Part III: Culture). Geneva, 1998.
[http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_\(part3\).pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1998/WHO_TB_98.258_(part3).pdf)

Anexo 1 – Posibles proveedores de reactivos y materiales consumibles

La siguiente tabla indica algunos proveedores y códigos de los productos para los reactivos y materiales consumibles necesarios para MODS. No es una lista exhaustiva, no necesariamente debe ser tomada como una recomendación; otros proveedores pueden ser capaces de proporcionar los mismos o similares productos a un mejor precio en algunas regiones. Sin embargo, a menudo se nos pregunta en donde se pueden comprar estos materiales, por lo que esta lista se destina para hacer frente a esa necesidad e incluye la mayoría de los proveedores que generalmente utilizamos o se han utilizado.

Item	Proveedor	Código de producto	Unidad
Caldo Middlebrook 7H9 (Difco)	Fisher	DF0713-17-9	500gr/frasco
Casitona (pancreatic digest casein)	Fisher	DF0259-17-9	500gr/ frasco
Glicerol (glicerina)	Sigma	G-33-500	500ml/ frasco
PANTA (mezcla de antibióticos liofilizado BD)	Fisher	B4345114	6 frascos/caja
OADC (enriquecimiento Middlebrook OADC BD)	Fisher	B11886	10 x 20ml/caja
Dimetil sulfoxido (Hibri-Max)	Sigma	D-2650	100ml/frasco
Stocks de antibióticos isoniacida rifampicina	Sigma	I-3377 R-3501	50 gr/frasco 1gr/frasco
Hidróxido de Sodio (pastillas)	Sigma	221465	500gr/frasco
Citrato de sodio (sal trisódico dihidratada)	Sigma	S-4641	500gr/frasco
N-acetil-L-cisteina	Sigma	A-7250	50gr/frasco
Fosfato de potasio monobásico en cristales. KH_2PO_4	Sigma	P0662	500gr/frasco
Fosfato de sodio dibásico anhidro. Na_2HPO_4	Sigma	S0876	500gr/frasco
Hipoclorito de sodio	lejía		
Tubos de centrifuga de 15ml de polipropileno con base cónica (falcon 35-2096)	Fisher	14-959-49B	500 unidades/caja
Placas de 24 pozos (Placas de tejido de 24 pozos BD Falcon 35-3047)	Fisher	08-772-1	50 placas/caja
Bolsas de polietileno tipo ziplock de 6 X 6 "			
Tubos de vidrio con tapa (16x100 mm)	Fisher	14932-1B	144 tubos/paquete
Tubos de microcentrifuga de 1.5ml con tapa rosca	Fisher	05-669-22	1000 unidades/caja
Filtros de jeringa azul de 0.22 μm Millex (para solventes acuosos)	Fisher	SLGL 025 OS	50 unidades/caja
Filtros de jeringa amarillo de 0.22 μm Millex (para solventes orgánicos)	Fisher	SLGV 033 RS	50 unidades/caja
Pipetas Pasteur de vidrio 9" de borosilicato	Fisher	13-678-20C	720 unidades/caja
Puntas con filtro de 1000-1300 μl	Fisher	02-707-51	1000 puntas/bolsa
Puntas amarillas de 1-200 μl	Fisher	1111-0006	1000 puntas/bolsa

Anexo 2 – Calculando "g" y rpm según la longitud del rotor de la centrifuga

$$g = (1.118 \times 10^{-5}) \times (\text{radio del rotor en cm}) \times (\text{rpm}^2)$$

Es necesario calcular las rpm para lograr 3000g recomendados,

$$\text{rpm} = \sqrt{3000 / ((1.118 \times 10^{-5}) \times (\text{radio del rotor}))}$$

Recuerde: 3000g NO es lo mismo que 3000rpm (revoluciones por minuto)

Anexo 3 – Método alternativo para la preparación de la solución de antibióticos

Este método alternativo está diseñado para preparar las soluciones de trabajo de los antibióticos utilizando jeringas de tuberculina si las micropipetas no están disponibles.

1. Solución stock de antibióticos

1.1. Stock de Isoniacida (0.4 mg/ml)

- Componentes**

Isoniacida	4 mg
Agua destilada estéril	10ml

- Procedimiento**

1. Disolver completamente 4mg de isonicida en 10ml de agua destilada estéril
2. Filtrar con un filtro de jeringa para **solventes acuosos** de 0.2µm
3. Almacenar en alícuotas de 120µl en tubos estériles de microcentrífuga a -20° hasta por 6 meses.

- Nota**

Cada alícuota almacenada de 120µl es suficiente para 100 muestras

1.2. Stock de Rifampicina (1 mg/ml)

- Componentes**

Rifampicina	10 mg
Dimetil sulfoxido (DMSO)	5ml
Agua destilada estéril	5ml

- Procedimiento**

1. Disolver completamente 10mg de rifampicina 5ml de DMSO, luego añadir 5ml de agua destilada estéril y mezclar
2. Filtrar empleando un filtro de jeringa para **solventes orgánicos** de 0.2µm.
3. Almacenar en alícuotas de 120µl en tubos estériles de microcentrífuga a -20°C hasta por 6 meses.

- Nota**

Cada alícuota almacenada de 120µl es suficiente para 100 muestras.

No congele de nuevo o re-use la solución de antibióticos porque la actividad de estos se pueden perder. Descarte todo el resto de la solución de antibióticos que no empleó al final del día de proceso

2. Diluciones de los antibióticos para la solución de trabajo

Las soluciones de trabajo de cada droga son preparadas el mismo día que se usa la solución stock. Las diluciones se realizan empleando 7H9 con OADC al 10% (7H9-OADC)

2.1. Solución de trabajo de isoniacida 4µg /ml

- **Componentes**

Alícuota de Isoniacida 0.4 mg/ml	120µl
Medio 7H9-OADC	

- **Procedimiento**

1. Empleando una jeringa de tuberculina, añadir 100µl de la solución stock descongelado (400µg/ml) a 900µl del medio 7H9-OADC (obteniendo el stock 2 de **INH, 40 µg/ml**).
2. Añadir los 100µl del stock 2 a cada 900µl de 7H9-OADC requerido (obteniendo la solución de trabajo de INH a 4 µg/ml).

- **Notas**

El volumen total preparado dependerá del número de muestras que se procesen.

Cada una de las muestras requiere 100µl de la solución de trabajo de INH. Un adicional de 200µl es necesario para los dos controles positivos.

2.2. Solución de trabajo de rifampicina 10µg /ml

- **Componentes**

Alícuota de Rifampicina 1.0 mg/ml	120µl
Medio 7H9-OADC	

- **Procedimiento**

1. Empleando una jeringa de tuberculina, añadir 100µl de la solución stock descongelada (1 mg/ml) a 900µl de medio 7H9-OADC (obteniendo el stock 2 de **RIF, 100µg/ml**).
2. Añadir los 100µl del stock 2 a cada 900µl de 7H9-OADC requerido (obteniendo la **solución de trabajo de RIF a 10µg/ml**).

- **Notas**

El volumen total preparado dependerá del número de muestras que se procesen.

Cada una de las muestras requiere 100µl de la solución de trabajo de RIF. Un adicional de 200µl es necesario para los dos controles positivos.

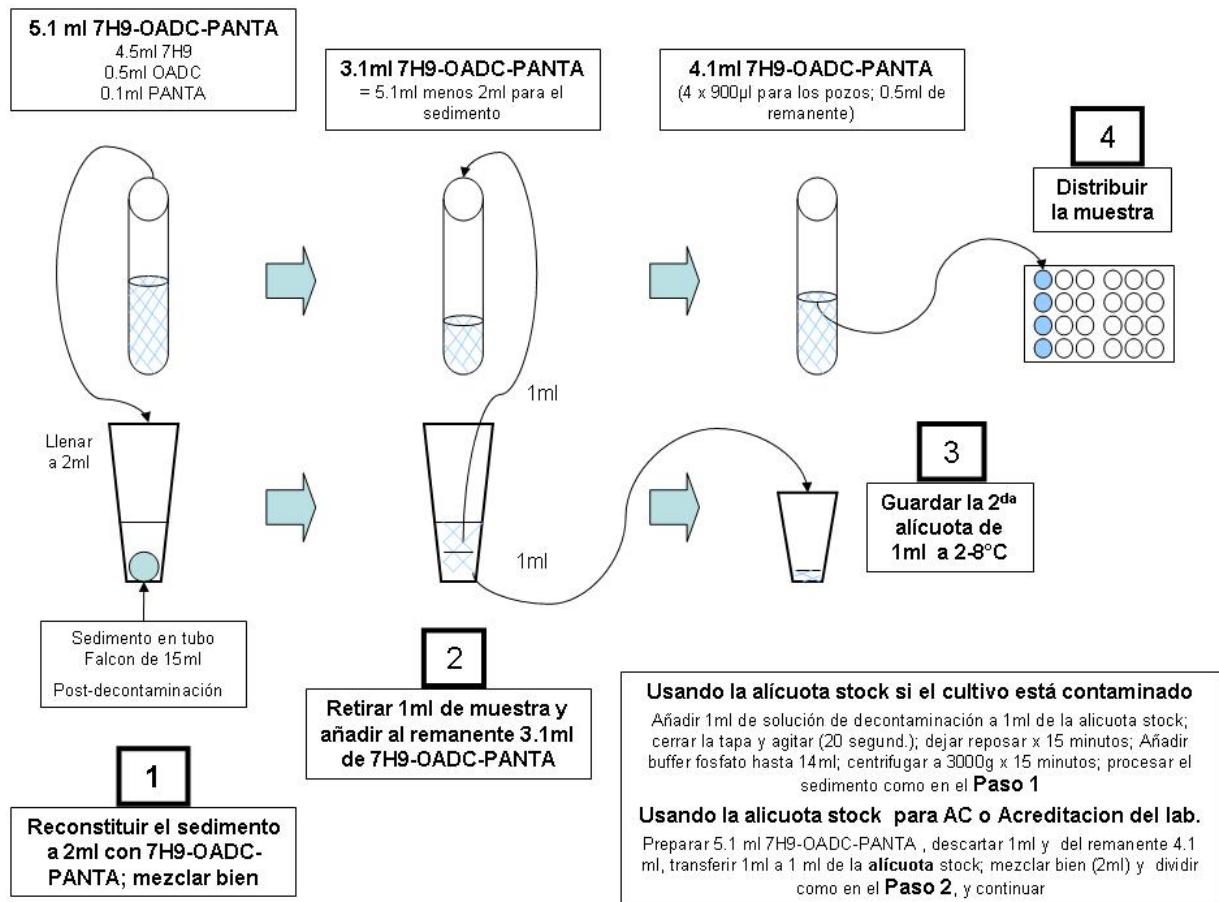
Diluciones de la solución de trabajo de los antibióticos – método alternativo

Stock de Antibiótico	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 le adiciona a la muestra (µg/ml)
Isoniacida 400 µg/ml	100µl stock / 900µl 7H9-OADC (40µg/ml)	1/10 4µg/ml	INH 0.4
Rifampicina 1000 µg/ml	100µl stock / 900µl 7H9-OADC (100µg/ml)	1/10 10µg/ml	RIF 1.0

Anexo 4 – Preparación de la suspensión de la muestra y de las alícuotas stocks

Las alícuotas stocks de las muestras deben prepararse cada vez que una muestra es procesada. Estas alícuotas stocks pueden ser utilizadas para su reprocessamiento, si se produce contaminación bacteriana o fúngica, para una verificación en ciego como parte de un programa de control de calidad externo o para ensayos adicionales.

Lo siguiente ilustra la preparación de las alícuotas stocks y el procedimiento de reprocessamiento:



Anexo 5 – 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.

Detección de TB		
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 TB		

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 TB		

Anexo 6 – Recuperación y criopreservación de los cultivos MODS positivos

Cuando pruebas adicionales son necesarias de un cultivo positivo de MODS, o se desea almacenar por un largo periodo estos cultivos positivos, en primer lugar se debe proceder a aislar las cepas.

Aquí se explica cómo recuperar las cepas a partir de cultivos positivos de las placas de MODS y cómo criopreservar estas. Las mismas técnicas de criopreservación y recuperación del cultivo se pueden utilizar para la preparación y almacenamiento de los controles positivos.

1. Recuperación de las cepas a partir de cultivos positivos de MODS

1.1. Preparación del agar Middlebrook 7H11 - 5% OADC

- Componentes**

Agar base Middlebrook 7H11	21 g
Glicerol	5ml
Agua destilada	945ml
OADC	50ml

- Procedimiento**

1. Disolver 21g del agar medio base 7H11 en 945ml de agua destilada estéril.
2. Añadir 5ml de glicerol.
3. Calentar y agitar constantemente hasta que se disuelva por completo (se puede emplear un agitador magnético). El medio debe cambiar a translúcido, no se debe sobrecalentar o hervir el medio.
4. Esterilizar en la autoclave a 121-124°C por 15 minutos.
5. Dejar que baje la temperatura a 50-55°C y añadir 50ml de OADC en condiciones estériles. Mezclar por 5 minutos y dispensar en placas petri (25-30ml por placa).
6. Dejar para que solidifique (evitar la exposición directa a la luz).
7. Verificar la esterilidad del medio incubándolo a 37°C por 24-48 horas.
8. Almacenar a 2-8°C.

1.2. Recuperación de cepas a partir de cultivos positivos de MODS

- Procedimiento**

1. Colocar en el interior de la Cabina de Bioseguridad las placas de MODS conteniendo los cultivos positivos que van a ser recuperados. Abra cuidadosamente la bolsa de plástico y retire la placa en forma aseptica.
2. Retirar el contenido de los 2 pozos control positivo con una pipeta Pasteur estéril (sólo se usan cultivos positivos de los pozos que no contienen rifampicina o isoniacida).

3. Inocular 50-100 μ l de la muestra recuperada en el agar 7H11 preparado como se ha indicado arriba. Empleando un asa de siembra estéril, realice estrías de la muestra en toda la superficie del agar, luego cubrir la placa petri.
4. Colocar el resto de la muestra en un tubo de vidrio estéril con tapa rosca y mantener a temperatura ambiente para algún uso adicional o en caso de contaminación
5. Incubar la placa petri con la muestra a 37°C durante 15-20 días para obtener el suficiente crecimiento para su criopreservación.

2. Criopreservación de las cepas de los cultivos de MODS en caldo Middlebrook 7H9

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

- **Componentes**

Caldo base Middlebrook 7H9	0.94 g
Glicerol	20ml
Agua destilada estéril	160ml
Suplemento ADC	20ml

- **Procedimiento**

1. Disolver 0.94g del caldo base Middlebrook 7H9 en 160ml de agua destilada estéril y añadir 20ml 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 20ml del suplemento enriquecedor ADC
5. Mezcle bien y verifique la esterilidad del medio incubándolo a 37°C por 24-48 horas
6. Dispense 0.9ml en crioviales en condiciones estériles, asegure bien la tapa y almacene a 2-8°C.

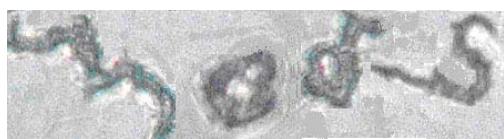
- **Nota**

Para este proceso se emplea ADC y **no OADC**

2.2. Criopreservación 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.



**Jorge Coronel
Martha Roper
Luz Caviedes
David Moore**

**Lima – Perú
Agosto, 2008**