

Optimización de muestras de alta calidad con OMNIGENE® SPUTUM para cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*

Bitapi Ray, Jacques Niles, Andy Stewart and Cassandra Kelly-Cirino
DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada

Desafío

Las técnicas basadas en cultivos siguen siendo el método de referencia para diagnosticar la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (MTb) y el análisis de la sensibilidad al fármaco. Las muestras de esputo no estandarizadas, podridas o de baja calidad ponen en peligro los resultados del cultivo e impiden el diagnóstico y el cuidado del paciente. Los procedimientos convencionales de descontaminación del esputo mediante NaOH/NAC pueden limitar la sensibilidad del cultivo y afectar a la eficiencia del laboratorio de varias formas: (1) El NaOH/NAC requiere preparación y control de calidad diaria, (2) el procesamiento estándar de 15 minutos puede reducir el MTb viable en las muestras en un 20 %-60 %¹, (3) un procesamiento insuficiente puede dar lugar a niveles elevados de contaminación, (4) el procesamiento excesivo puede reducir de forma significativa la viabilidad del MTb y tener como resultado falsos negativos y (5) las restricciones del tiempo de procesamiento evitan el procesamiento por lotes de un día para otro o los fines de semana.

Solución

OMNIGENE® SPUTUM proporciona una alternativa flexible al procesamiento con NaOH/NAC y al transporte o almacenamiento con cadena de frío. Este reactivo fácil de usar es un producto químico estable (vida útil de almacenamiento de 1 año) y no tóxico que licua y descontamina el esputo a la vez que mantiene la viabilidad de MTb (véanse los resultados más abajo). OMNIGENE® SPUTUM se añade a las muestras con una proporción de aproximadamente 1:1 y se usa de dos maneras principales: 1) en el punto de recolección para un transporte fiable y más fácil de muestras de alta calidad sin cadena de frío, o 2) como reactivo añadido en el laboratorio que optimiza las muestras y permite un almacenamiento de varios días y el procesamiento por lotes sin refrigeración.

Además de estabilizar las muestras a temperatura ambiente, OMNIGENE® SPUTUM ayuda a mejorar los resultados de los cultivos al reducir la putrefacción y la contaminación de los cultivos y disminuir la pérdida de MTb viable en comparación con los efectos derivados del tratamiento con NaOH/NAC. Otros beneficios importantes de OMNIGENE® SPUTUM son que simplifica los flujos de trabajo del laboratorio, se integra de forma fluida con los algoritmos de diagnóstico establecidos y es compatible con cultivos sólidos y líquidos (BBL® MGIT®), además de con otros métodos de diagnóstico de MTb (p. ej., microscopía de frotis, análisis Cepheid® GeneXpert® MTB/RIF, Hain Lifescience GenoType MTBDRplus^{2,3}). Al complementar estos beneficios, OMNIGENE® SPUTUM puede ayudar a los laboratorios y programas nacionales a reducir los costes relacionados con 1) la estabilización mediante cadena de frío durante el transporte y 2) el trabajo rutinario de laboratorio adicional que se requiere para la preparación, el procesamiento y el control de calidad del NaOH/NAC.

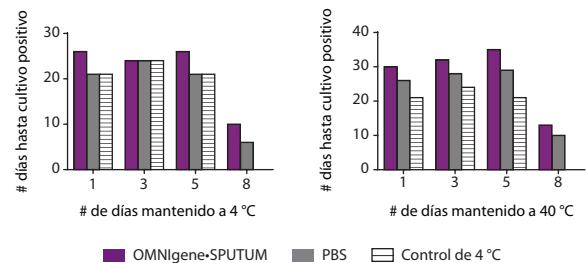


Figura 1: Impacto de OMNIGENE SPUTUM en la viabilidad de MTb

Método

A los volúmenes de OMNIgene•SPUTUM y solución salina fosfatada (PBS), se añadieron respectivamente 10^5 ufc/mL (para los puntos de tiempo de 1, 3 y 5 días) o 3×10^6 ufc/mL (punto de tiempo de 8 días) de MTb atenuado (aMTb; H37Ra) y se mantuvieron a 4 °C o 40 °C hasta 8 días. También se añadió a una solución de control (PBS+Tween) de la forma descrita y se almacenó a 4 °C durante 5 días. Cada muestra se centrifugó durante 20 minutos a $3500 \times g$ para formar el sedimento, que después se volvió a poner en suspensión en 400 μ L de PBS estéril. De cada preparación de sedimento resuspendido se inocularon 200 μ L en cultivo líquido, se incubó a 37 °C y se comprobó a diario. Para los puntos de tiempo de 1, 3 y 5 días, se cultivaron los cultivos en caldo Middlebrook y se estimó la viabilidad visualmente respecto al estándar de turbidez de McFarland. Los cultivos se consideraron positivos (es decir “tiempo hasta cultivo positivo” en días) cuando se alcanzó un valor de McFarland de 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/mL). Para el punto de tiempo de 8 días, se cultivaron los cultivos en caldo MGIT y se consideraron positivos cuando el lector BACTEC® MicroMGIT® activó una lectura positiva.

Conclusión

La adición de aMTb a OMNIgene•SPUTUM produce crecimiento en cultivo líquido tras 8 días a 4 °C o 40 °C. Se observó un pequeño retraso en el tiempo hasta el cultivo positivo (3-4 días) en las muestras de OMNIgene•SPUTUM mantenidas a 40 °C en comparación con aMTb incubado en PBS.

Compatibilidad

OMNIgene•SPUTUM es compatible con cultivos líquidos y mantiene el MTb viable durante al menos 8 días entre 4 °C y 40 °C.

Preguntas frecuentes

- 1. ¿Con qué métodos de cultivo es compatible OMNIgene•SPUTUM?**

El reactivo funciona con métodos de cultivo sólidos y líquidos usados habitualmente para la detección de MTb, incluyendo MGIT.
- 2. ¿Puede proporcionar más información acerca de cómo se usa OMNIgene•SPUTUM?**

OMNIgene•SPUTUM es un reactivo a granel que se añade en una proporción de aproximadamente 1:1 a las muestras de esputo, incluyendo el esputo inducido y expectorado y muestras de lavado bronquial. El producto se puede añadir en el momento de la recolección para licuar el esputo, eliminar la flora de fondo y mantener la viabilidad de MTb durante el transporte al laboratorio. El reactivo también se puede usar como alternativa al NaOH/NAC comercialmente disponible en el laboratorio para licuar y descontaminar muestras de esputo. Las muestras tratadas con OMNIgene•SPUTUM se pueden centrifugar para formar sedimentos bacterianos compatibles con todos los flujos de trabajo rutinarios de diagnóstico molecular, de cultivos y frotis.
- 3. ¿Puede sustituir OMNIgene•SPUTUM el procesamiento con NaOH/NAC?**

Sí. OMNIgene•SPUTUM licua y descontamina las muestras de esputo en 15 minutos, lo cual hace de este reactivo un sustituto óptimo para el NaOH/NAC en el laboratorio. Una característica añadida de OMNIgene•SPUTUM es su capacidad de conservar la viabilidad de MTb durante al menos 8 días a temperaturas de hasta 40 °C, lo cual permite a los laboratorios procesar las muestras por lotes y aumentar la eficiencia. La larga vida útil de almacenamiento de 1 año del reactivo elimina la preparación diaria de NaOH/NAC y los pasos de control de calidad asociados que actualmente se requieren para este procesamiento.
- 4. ¿Cómo afecta OMNIgene•SPUTUM al tiempo hasta el cultivo positivo, especialmente para las muestras débil y medianamente positivas?**

Nuestros datos demuestran que las muestras mantenidas en OMNIgene•SPUTUM durante 8 días entre 4 °C y 40 °C conservan MTb viable y solo muestran un retraso menor en el tiempo hasta el positivo.
- 5. ¿Cómo afecta OMNIgene•SPUTUM a la viabilidad de MTb?**

OMNIgene•SPUTUM conserva la viabilidad de MTb durante al menos 8 días entre 4 °C y 40 °C. Las muestras de esputo mantenidas a 4 °C mantendrán la viabilidad más tiempo, mientras que las muestras no tratadas sometidas a temperaturas ambiente más elevadas sufrirán una mayor pérdida de viabilidad con el tiempo. Las muestras tratadas con el procesamiento estándar con NaOH/NAC perderán entre el 20 % y el 60 % de MTb en 15 minutos¹.
- 6. ¿Puede OMNIgene•SPUTUM reducir las tasas de contaminación de los cultivos?**

Sí. Cuando se añade en el momento de la recolección, el reactivo mata la flora de fondo que está presente en el esputo. Esto puede reducir la contaminación asociada con las condiciones de muestreo y transporte o provocada por un procesamiento subóptimo con NaOH/NAC. El reactivo no afecta a la contaminación que tiene lugar durante la inoculación del cultivo (es decir, por error humano o procedimientos de laboratorio en este paso).
- 7. ¿Puede reducir OMNIgene•SPUTUM la putrefacción de la muestra de esputo?**

La adición de OMNIgene•SPUTUM en el momento de la recolección descontaminará las muestras de esputo y, por lo tanto, reducirá el crecimiento excesivo contaminante y la putrefacción de las muestras en comparación con el envío de muestras no tratadas ni estabilizadas.
- 8. ¿Puedo hacer cultivos directamente a partir de una muestra tratada con OMNIgene•SPUTUM?**

No. OMNIgene•SPUTUM es bacteriostático, se debe eliminar mediante un sencillo paso de centrifugado antes del cultivo para MTb.

Referencias:

- ¹ Mitali Chatterjee et al. Effects of different methods of decontamination for successful cultivation of Mycobacterium tuberculosis. *IJMR*. Oct 2013; 138(4):541-548
- ² OMNIgene•SPUTUM data sheet. DNA Genotek. PD-BR-00195.
- ³ C. D. Kelly-Cirino et al. Maximizing centralized testing models and GeneXpert hubs with OMNIgene•SPUTUM. DNA Genotek. PD-WP-00044.

Puede que algunos productos de DNA Genotek no estén disponibles en todas las regiones geográficas.

*OMNIgene es una marca registrada de DNA Genotek Inc. Todas las demás marcas y nombres incluidos en el presente documento son propiedad de sus respectivos propietarios. Todos los protocolos, informes oficiales y notas de aplicación están disponibles en la sección de ayuda en nuestro sitio web www.dnagenotek.com.