



Utilidad del papel filtro como medio de transporte para la preservación de muestras de esputo en el diagnóstico de tuberculosis

Angie Juliana Jiménez Montero

Cristy Nicol Suárez Herrera

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología

Trabajo de Grado

Bogotá D.C. 18 Enero 2019



Utilidad del papel filtro como medio de transporte para la preservación de muestras de esputo en el diagnóstico de tuberculosis

Asesor interno:
Docente Edith Hernández Rojas

Asesores externos:
Claudia Llerena Polo directora de redes de salud pública del INS
Gloria Mercedes Puerto Castro directora de investigación de micobacterias del INS

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología

Trabajo de Grado

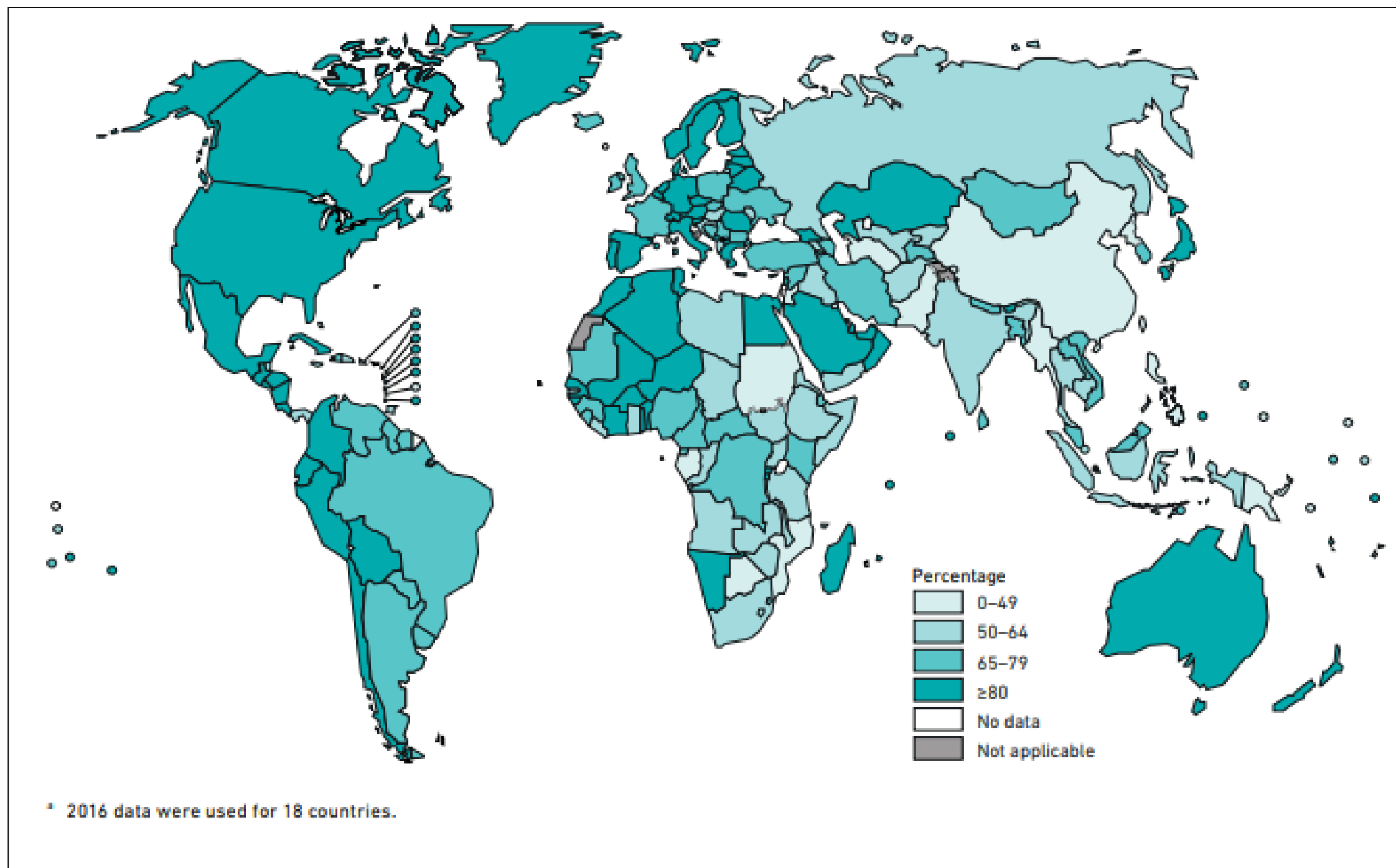
Bogotá D.C. 18 Enero 2019

INTRODUCCIÓN

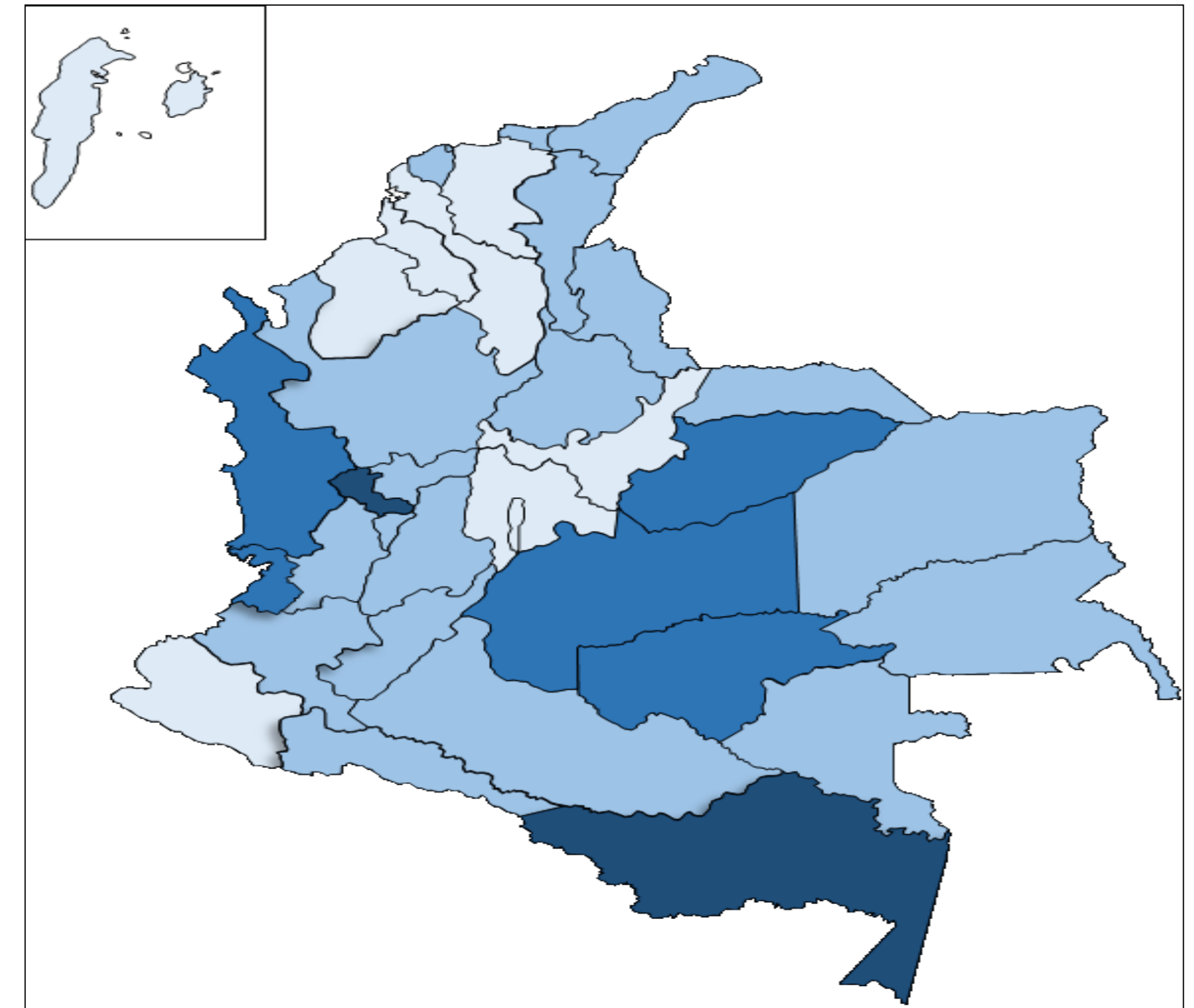
Tuberculosis mundial

La OMS ha declarado la tuberculosis como un problema de salud pública

Reporte global de TB se registraron para el 2017 6.4 millones de casos
En Colombia el 80% de los casos reportados son tuberculosis pulmonar.



http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/



http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

SIVIGILA 2017

Casos: 14480
Tuberculosis Pulmonar: 12056
Sexo masculino: 9316
Incidencia : 26

Dptos con mayor incidencia:
Amazonas: 59.0
Risaralda: 50.4
Meta: 47.7

Entidades territoriales
Antioquia (18.3%)
Valle del Cauca (13.3%)
Bogotá (7.8%)

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*



<http://www.ans.gov.au/7041271>

Dominio:	Bacteria
Filo:	<i>Actinobacteria</i>
Orden:	<i>Actinomycetales</i>
Suborden:	<i>Corynebacterineae</i>
Familia:	<i>Mycobacteriaceae</i>
Género:	<i>Mycobacterium</i>

https://es.wikipedia.org/wiki/Actinobacteria#/media/Archivo:Mycobacterium_tuberculosis.jpg

- Bacilos Acido alcohol resistentes (3 - 5 μm)
- Inmóviles, no esporulados, sin capsula
- Aerobio estricto
- Intracelular obligado
- División celular 20-22hr
- Crecimiento lento 4-8 semanas
- A 37°C, pH 7.0 a 7.2

Historia natural de la enfermedad

De la población que ha tenido contacto con tuberculosis el 10% desarrolla la enfermedad

TRANSMISIÓN



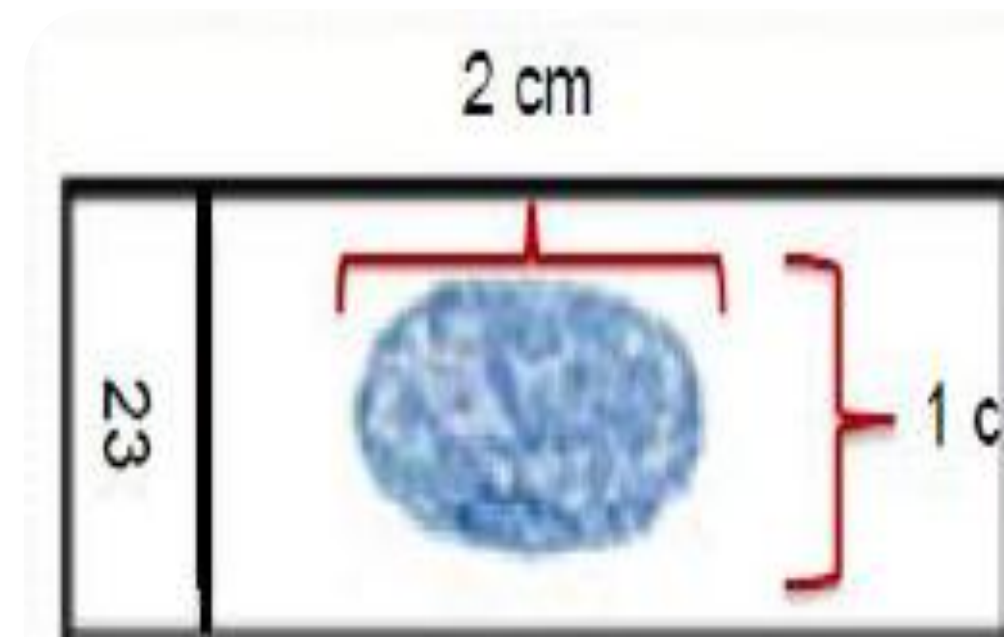
FACTORES DE RIESGO

- Enfermedades Inmunosupresoras
- Farmacodependencia
- Población vulnerable
- Hacinamiento
- Profesionales de la Salud

Contacto con el bacilo: primo infección
Involución a la curación: enfermedad
Periodo de incubación: 19 a 56 días

Diagnóstico Bacteriológico

CONFIRMADO



<http://asam2603.blogspot.com/2015/06/diagnostico-por-baciloscopia.html>

- Microscopía
Baciloscopia
(Ziehl Neelsen, Auramina)

Laboratorio Clínico



<http://asam2603.blogspot.com/2015/06/diagnostico-por-cultivo.html>

- Cultivo:
 - Medio Sólido: (LJ, OK, STG)
 - Medio Líquido (MGIT) – PSF,
 - Complementaria: Inmunocromatografía



<https://www.sochradi.cl/informacion-a-pacientes/torax-y-cardiovascular/radiografia-torax/>

- Pruebas Moleculares PCR:
 - Xpert MTB/RIF(OMS)
 - LPA
 - (Anyplex, Genotype)

Papel filtro

- ❖ Matriz de celulosa estéril
- ❖ Capacidad de retención
- ❖ Conserva humedad.
- ❖ Alternativa económica almacenamiento a Temperatura ambiente

Soporte de transporte para muestras biológicas y microorganismos.

Muestra de heces para transporte: Shigella spp.
Muestra de sangre seca para pruebas de aglutinación: sífilis
Muestra de esputo para conservación : Mycobacterium tuberculosis (2001)

No se registran estudios de su utilidad como medio de transporte para muestra de esputo.



<https://laborimportshop.com.br/wp-content/uploads/2017/03/papel-filtro.jpg>

OBJETIVOS

General:

Evaluar la utilidad del papel filtro como medio de transporte para la preservación de muestras de esputo con baciloscopia positiva para la identificación de tuberculosis, en cuatro departamentos de Colombia durante el año 2018.

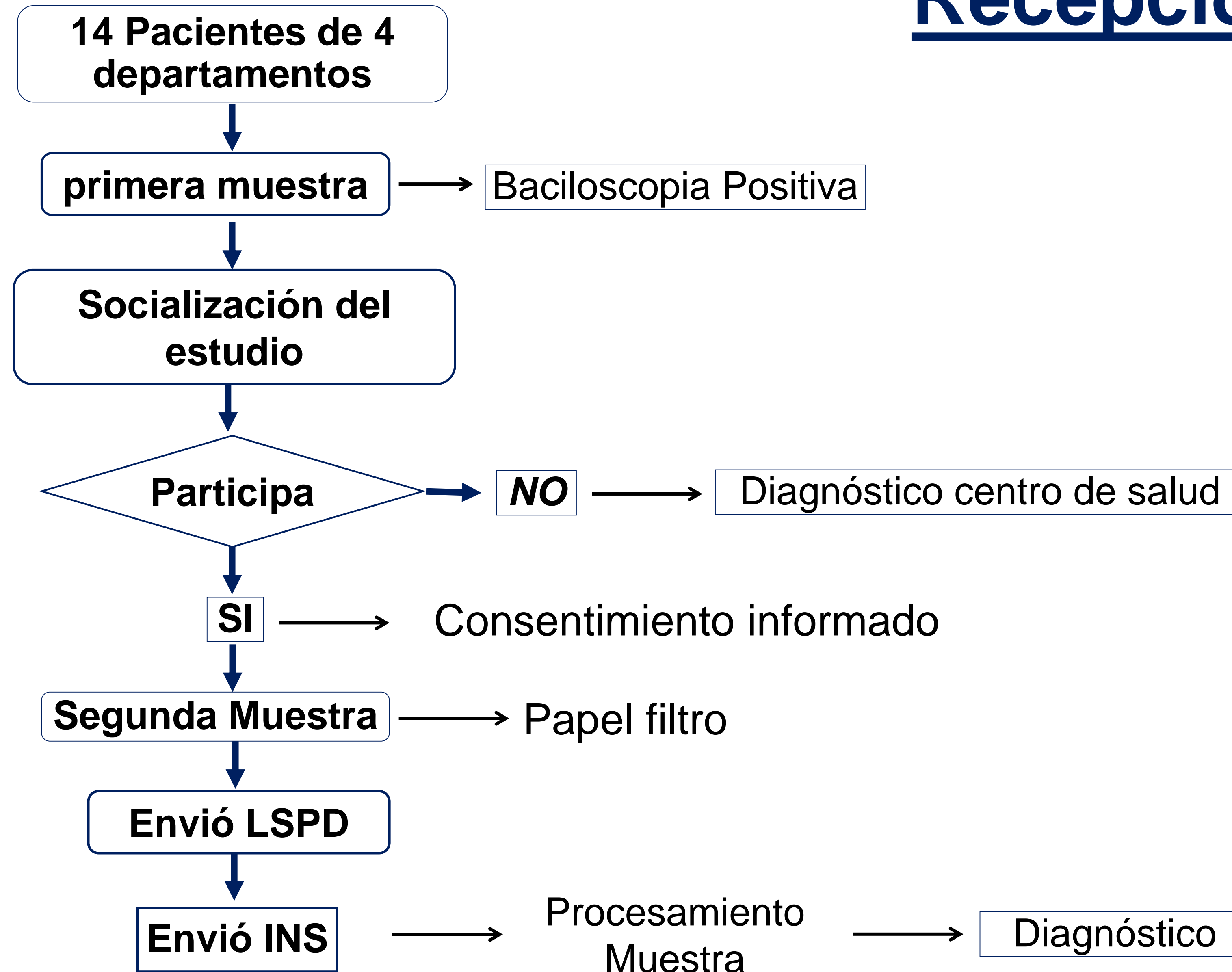
Específicos:

Valorar el uso de papel filtro para recuperación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en medio de cultivo a partir de muestras de esputo con baciloscopias positiva.

Determinar la utilidad del papel filtro impregnado con muestras de esputo con baciloscopia positiva en metodologías moleculares para obtención de resultados diagnósticos.

METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

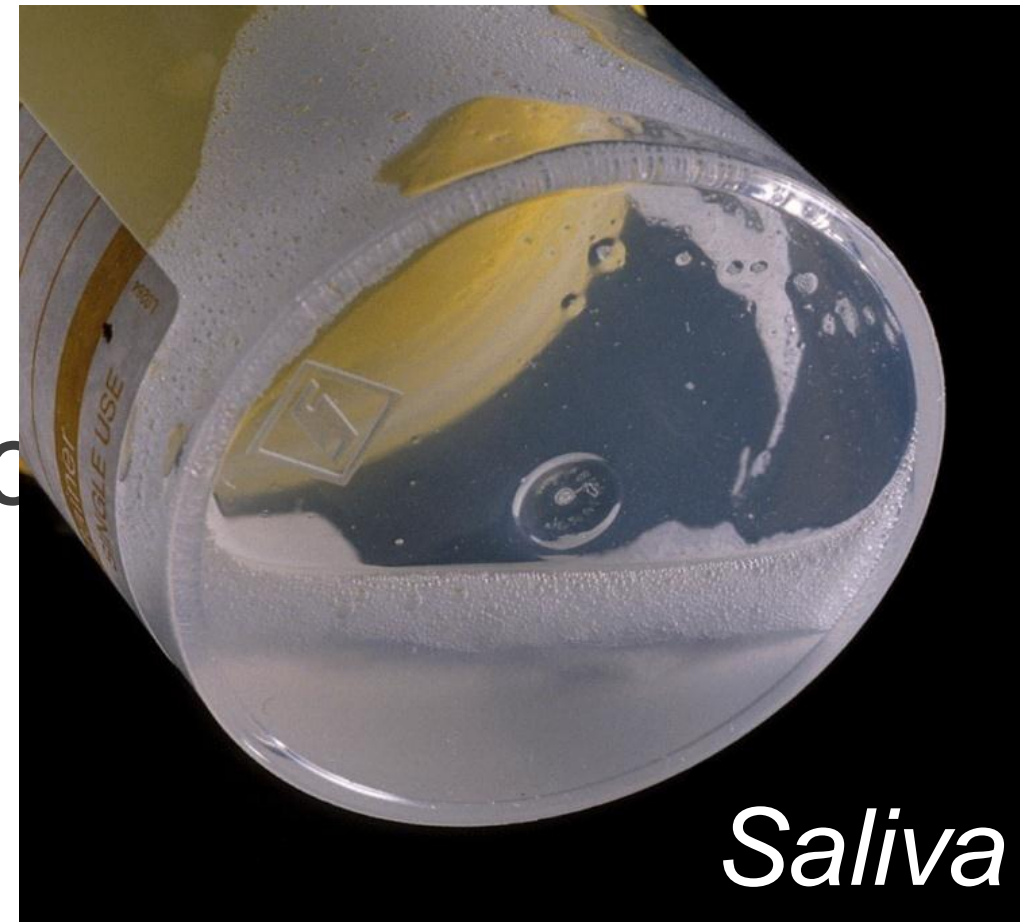
Recepción del paciente



Recolección y transporte de la muestra



Fuente propia



Fuente propia

RECOLECCIÓN

- Frasco estéril boca ancha
- Papel filtro Whatman N°2 estéril 4 cm
 - Baciloscopia
- Conservación 15 días.



Fuente propia

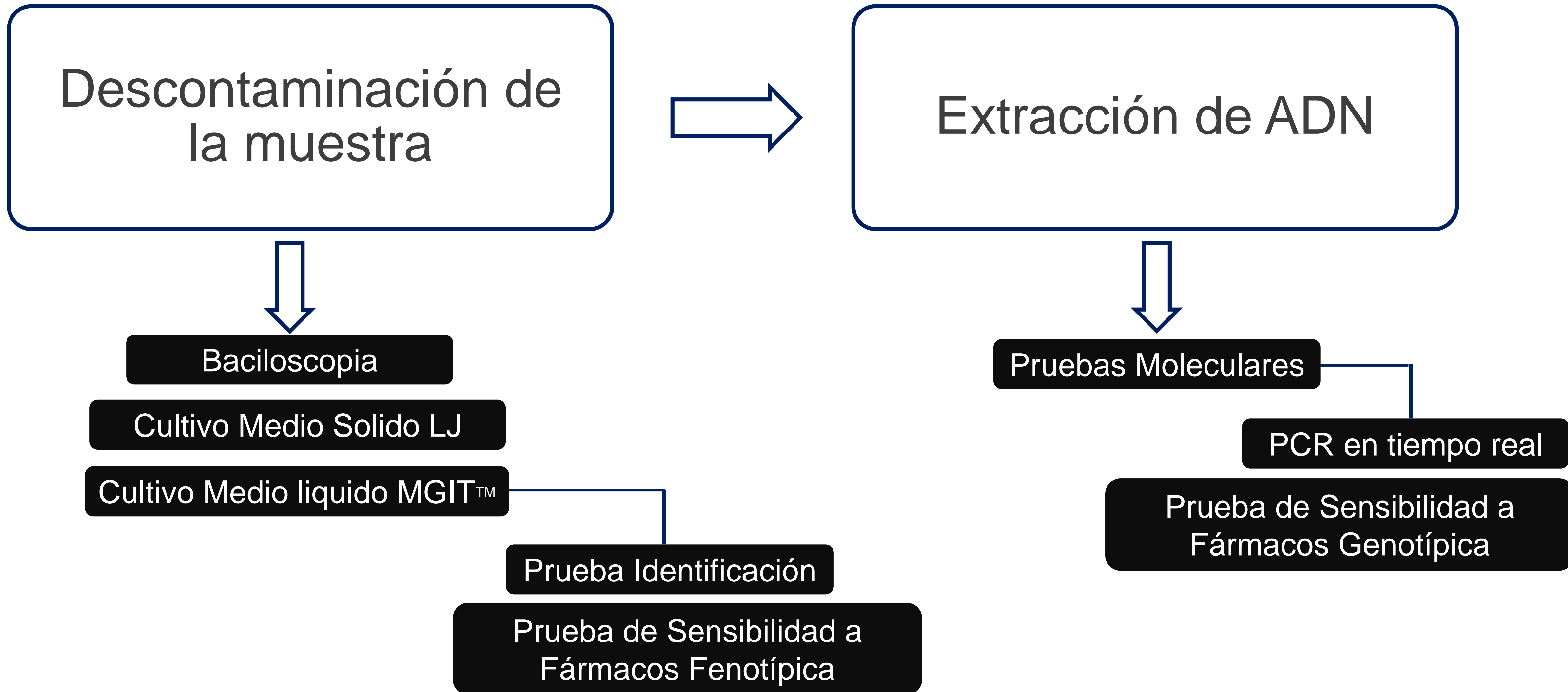


Fuente propia

TRANSPORTE

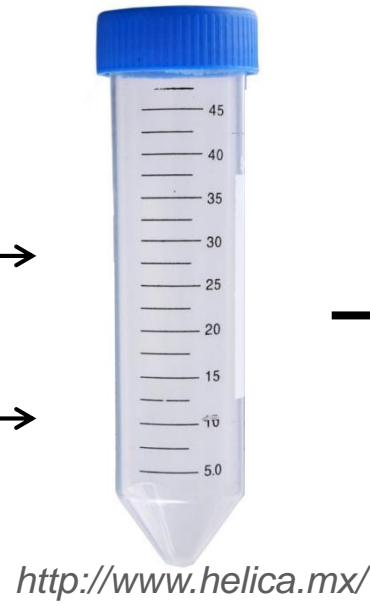
- Sistema de triple embalaje
- Documentos (Formato único de vigilancia de las micobacterias, consentimiento informado)

Procesamiento de la muestra en el INS



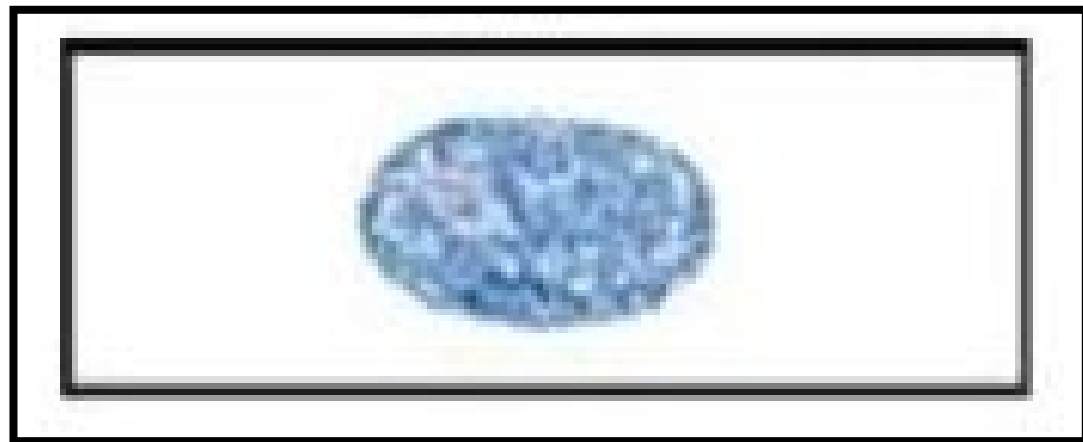
Descontaminación de la muestra

N- Acetil- Cisteína
Muestra

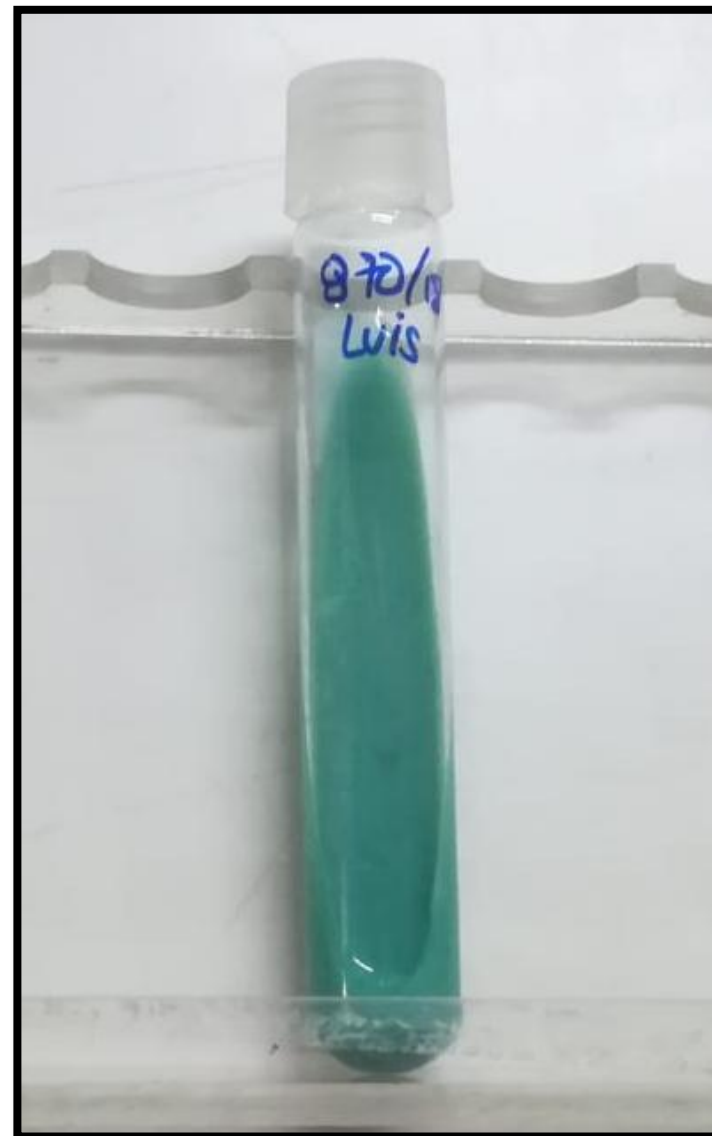


Pellet

100µl Baciloscopia



200µl medio solido LJ



500µl medio liquido MGIT™



2 Lavados

200µl Px moleculares



Pruebas de identificación y de sensibilidad a fármacos fenotípica

Medio liquido
MGIT™ positivo



<http://slideplayer.es/slide/6999158/22/images/12/Lectura+de+la+Baciloscopia.jpg>



Inmunocromatografía



Ag MPT64



Fuente propia



Complejo
Mycobacterium tuberculosis



Sensibilidad a
Isoniacida y
Rifampicina
Bactec™ MGIT™



Crecimiento de
UFC



Sensible

Resistente

Extracción de ADN

Pruebas moleculares



<http://www.helica.mx/>

Inactivación 100°C

Lisis enzimática
Lisozima
Proteínasa K + SDS 70%

Desproteínización
CTAB/NaCl, NaCl 5M

Separación de fases
Cloroformo alcohol isoamílico

Precipitación ADN
Isopropanol

Lavados al ADN
Etanol 70%

Resuspensión del ADN
Buffer tris EDTA 0.1X

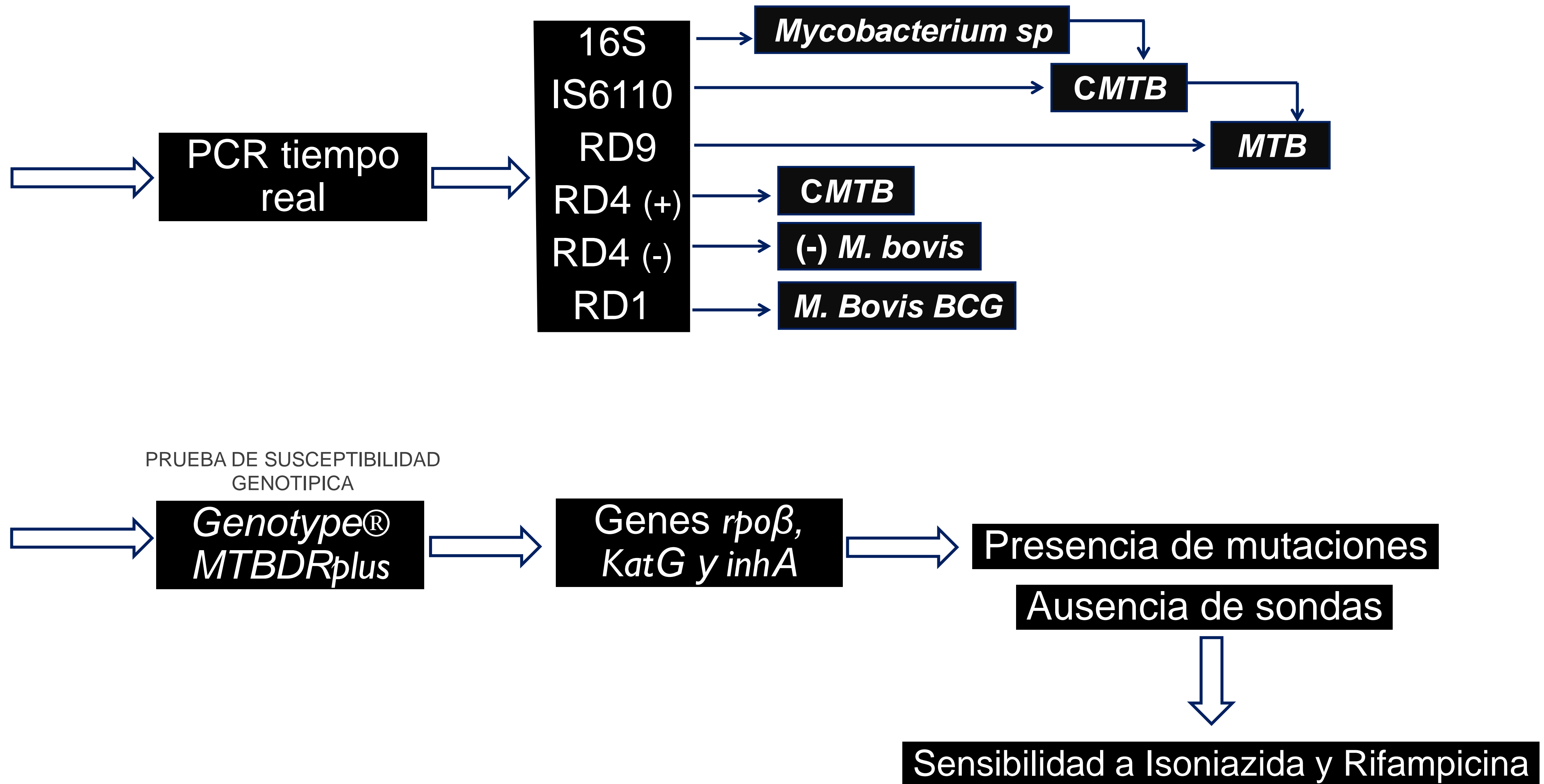


<http://2015.igem.org/Team:LaVerne-Leos/Project>

Pruebas moleculares



<http://2015.igem.org/Team:LaVerne-Leos/Project>



Iniciadores utilizados para la PCR *tiempo real*

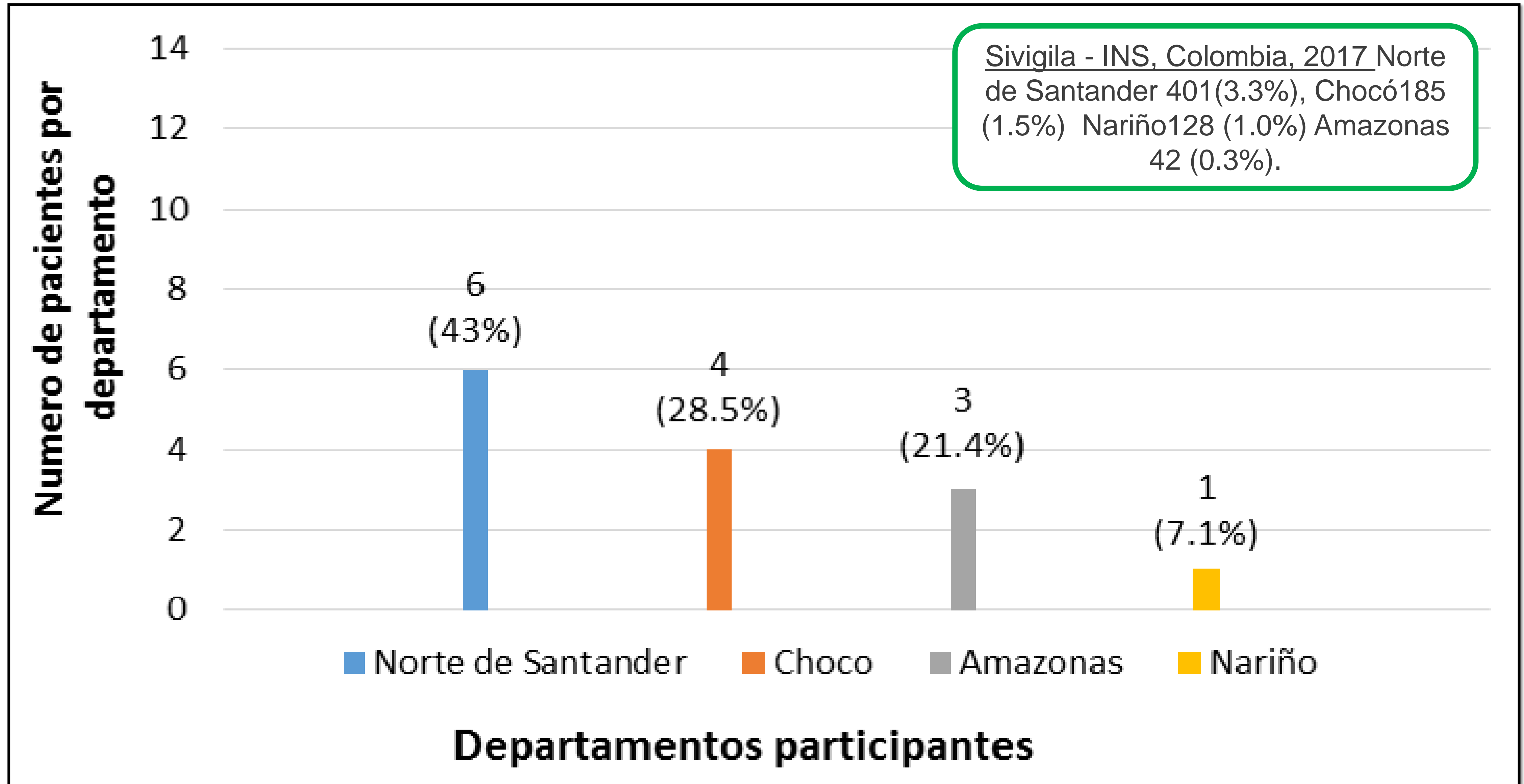
PCR	Gen	Reverse	Forward	Tamaño pb	Referencia
PCR 1	IS6110	CGTGAGGGGCATCGAGGTGGC	GCGTAGGCGTCGGTGACAAA	245	Capcha L. <i>et al</i> , 2005
	16S rRNA	TGCACACAGGCCACAAGGGA	CAACGCGAAGAACCTTACCT	78	Pinsky B. & Banaei N, 2008
	RD9 presencia	GAGCATTCTCGCTCCGAAT	TTTCGAGCCGTAAACTGTG	51	
PCR 2	RD1 delección	TTCAACGGGTTACTGCGAAT	GGATTTGACGTCGTGCTTCT	222	
	RD4 presencia	CATGCGCCCTATTTGATCTC	AGAAGCGCAACACTCTTGGA	55	
	RD4 Delecion	TTGCTGAAAAATGGCTATTGA	AGAAGCGCAACACTCTTGGA	94	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

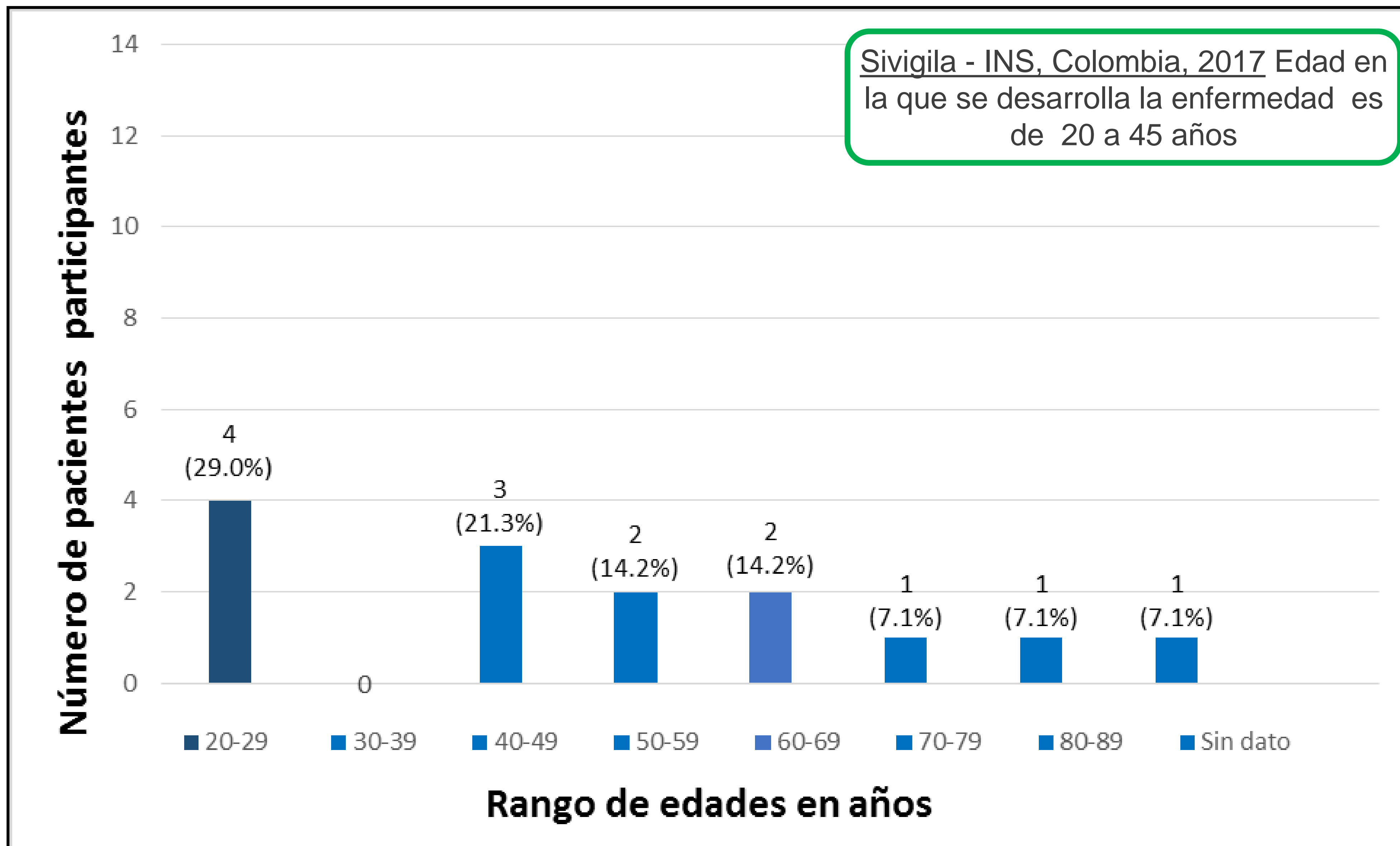
SOCIO DEMOGRÁFICOS

Procedencia departamental de las muestras

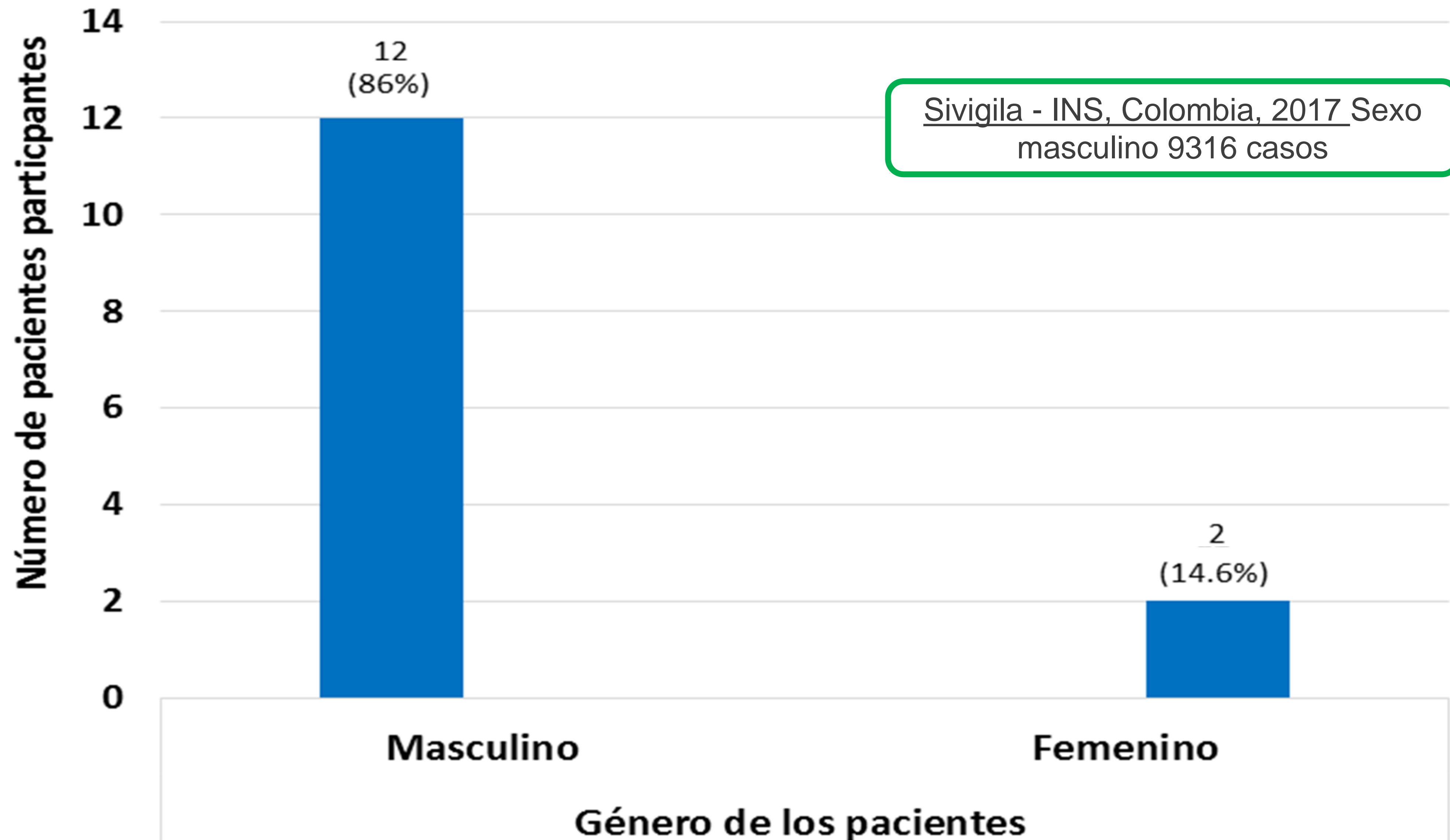
NUMERO DE MUESTRAS:14



Rango de edades de los pacientes participantes



Género de los pacientes participantes



PRUEBAS CONVENCIONALES

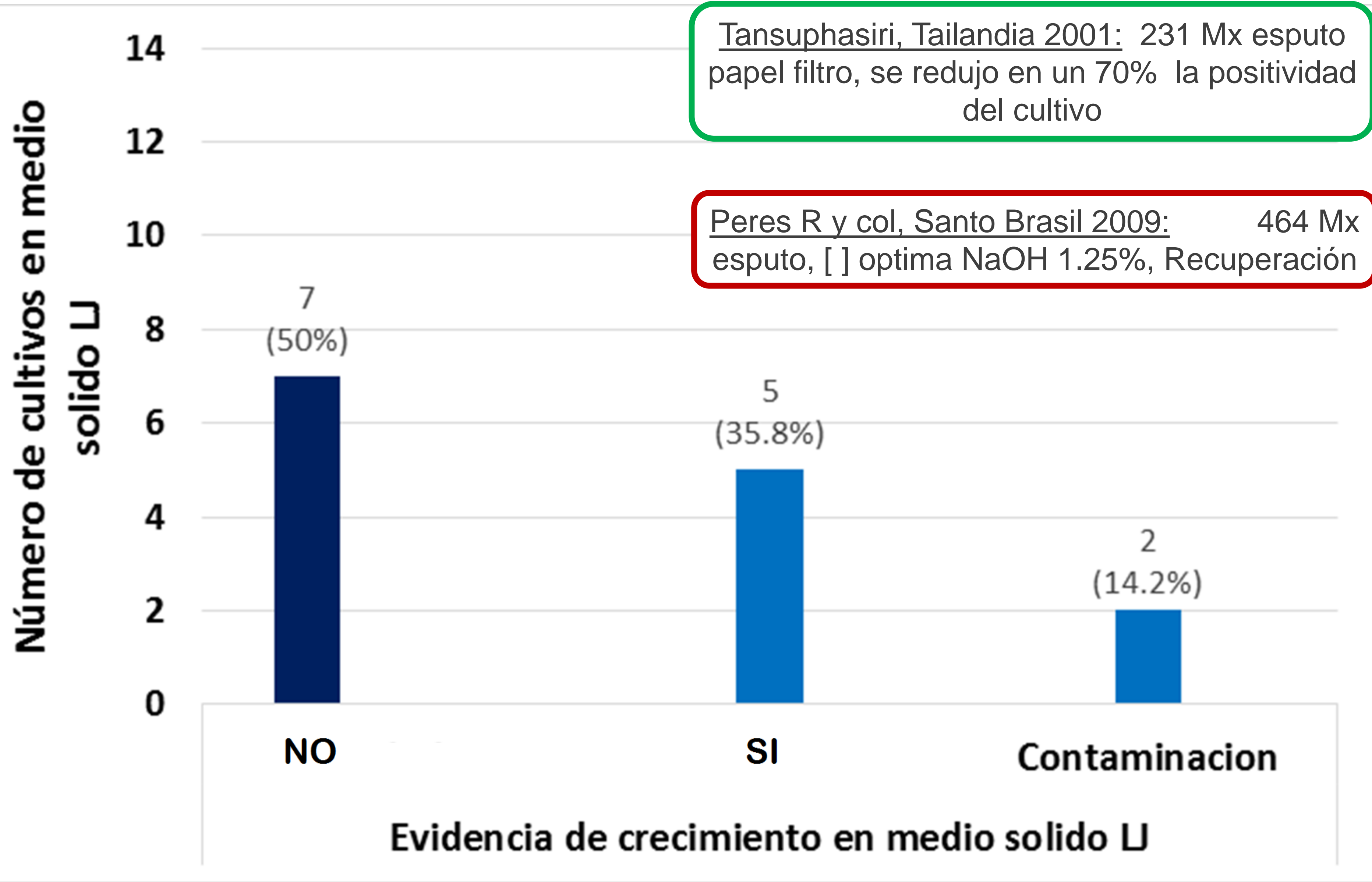
Concordancia entre baciloscopias en las IPS y el INS

DEPARTAMENTO	POSITIVIDAD DIRECTA IPS DEPARTAMENTALES			POSITIVIDAD CONCENTRADA INS		
	1+	2+	3+	1+	2+	3+
Amazonas		3			3	
Choco	2		2	2	1	1
Nariño			1			1
Norte de Santander		5	1	2	4	
Total positividad	2	8	4	<u>4</u>	8	2

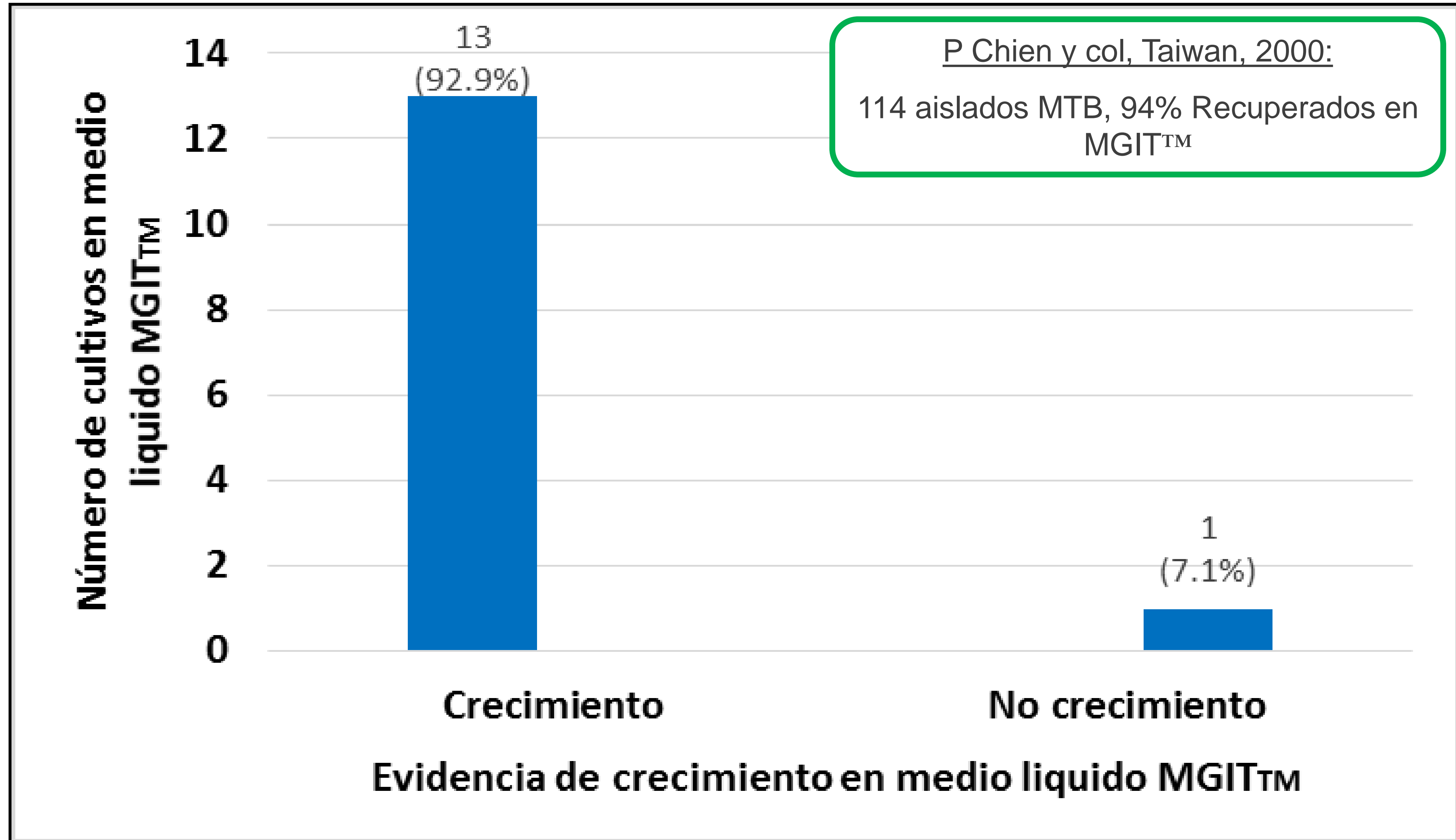
Manual para diagnostico bacteriologico, OPS 2008,
Colombia Reducción entre positividad concordante
a 1+

Alados Juan, C y col, Granada, 2000
Reducción bacilar, [] Mx, Descontaminación

Crecimiento en cultivo medio solido LJ

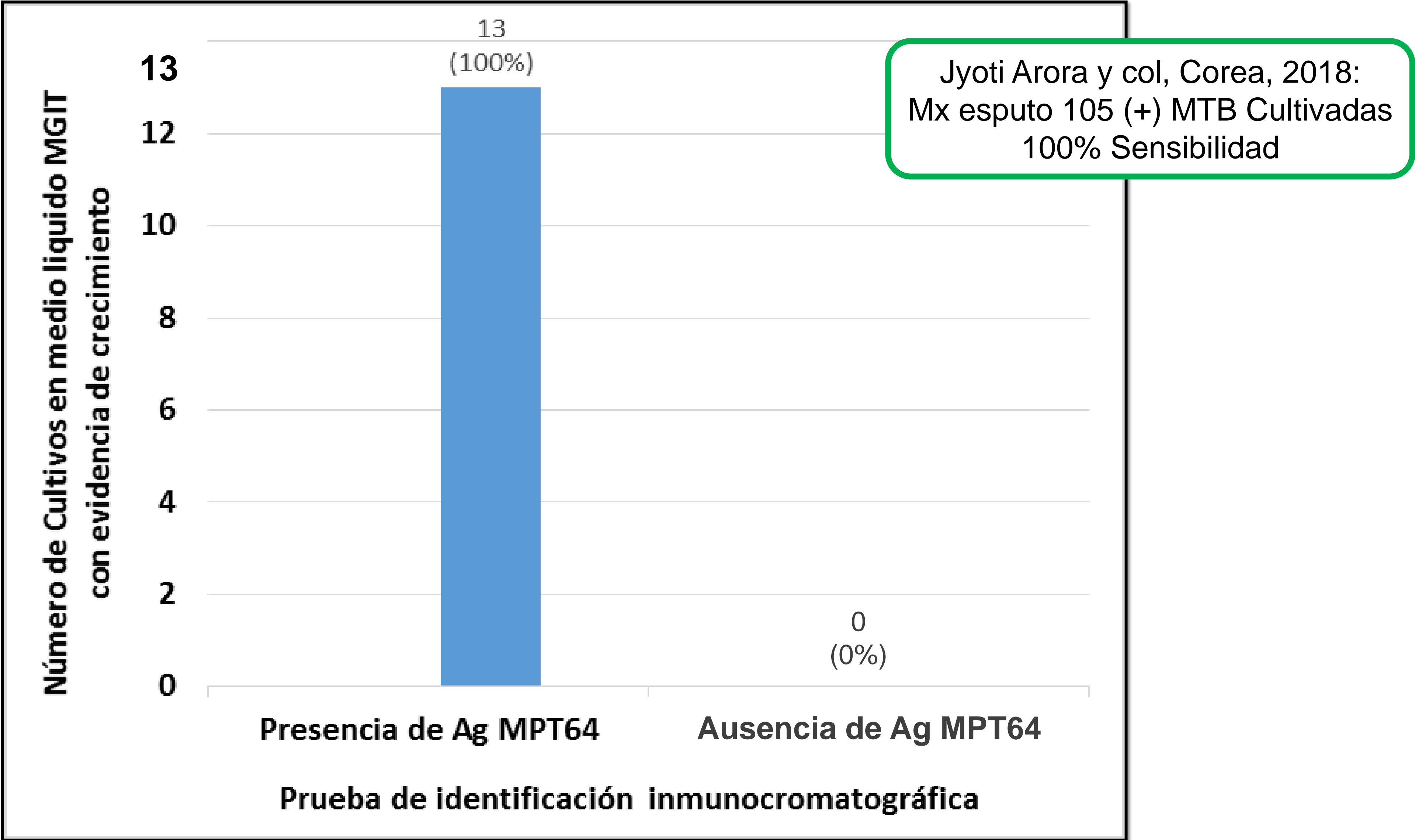


Crecimiento en cultivo medio liquido MGIT™



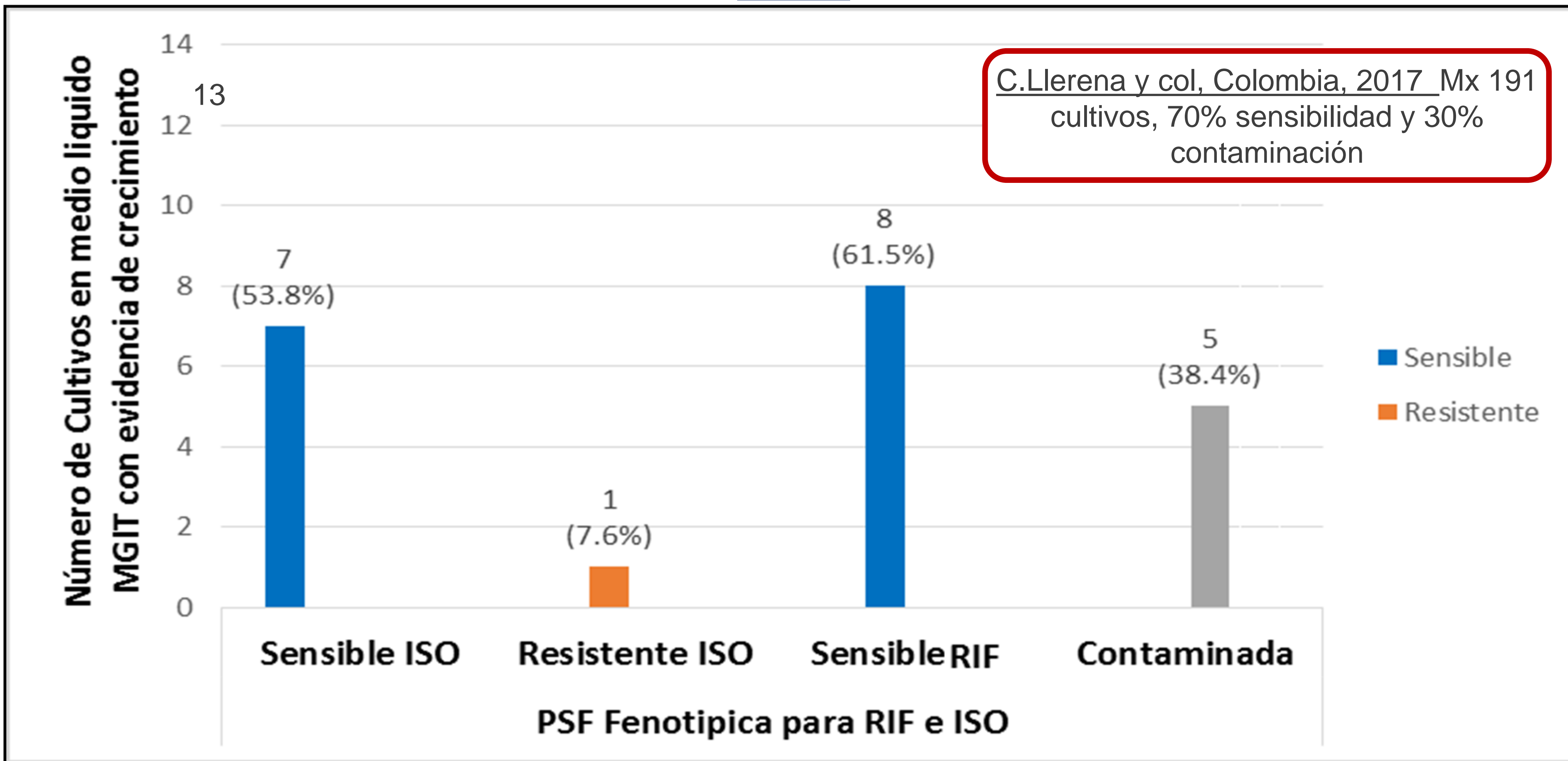
PRUEBAS APARTIR DEL MEDIO LIQUIDO MGIT™
POSITIVO

Prueba de identificación inmunocromatográfica para MTB



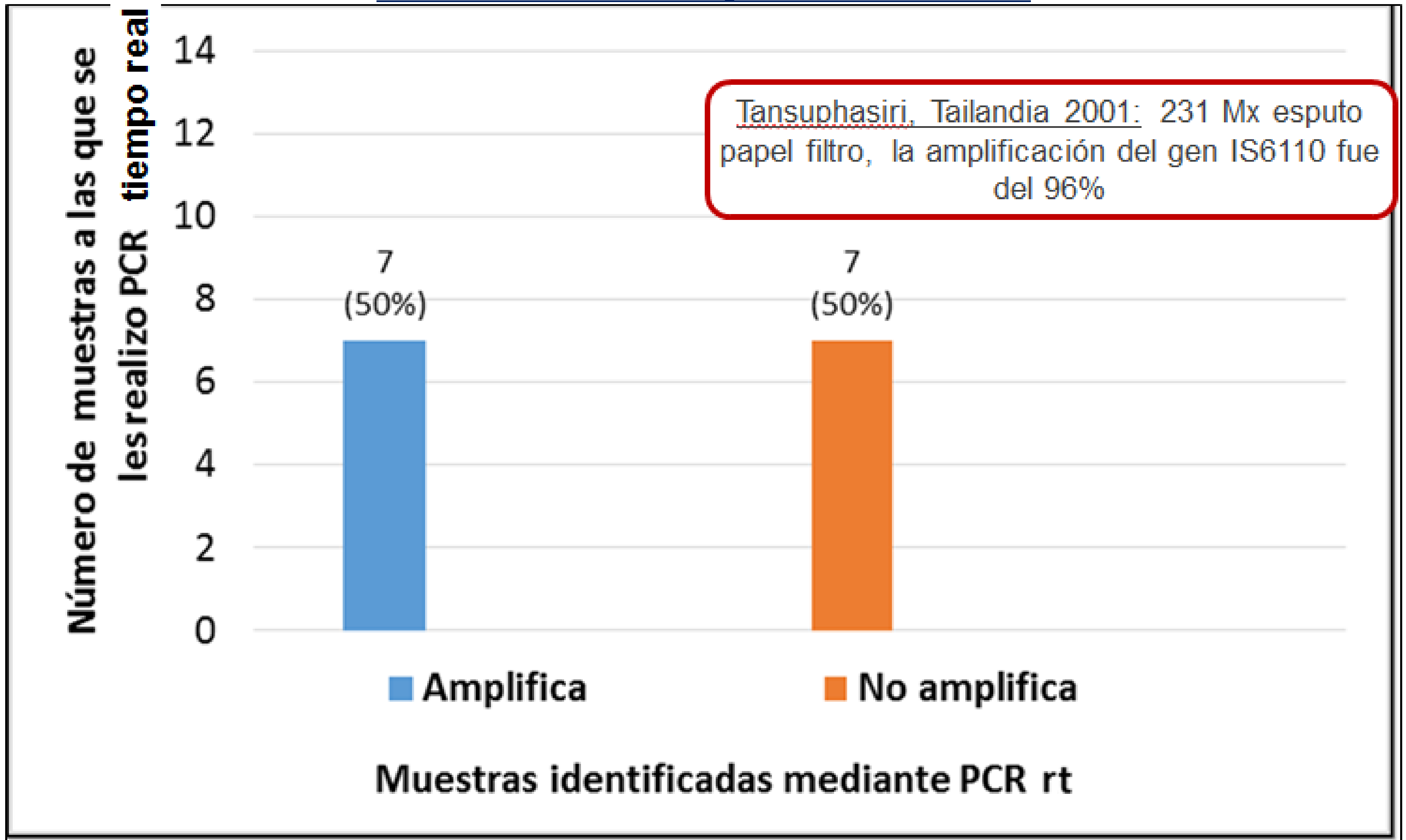
Prueba de sensibilidad fenotípica - Bactec MGIT™

960



PRUEBAS MOLECULARES

PCR en tiempo real

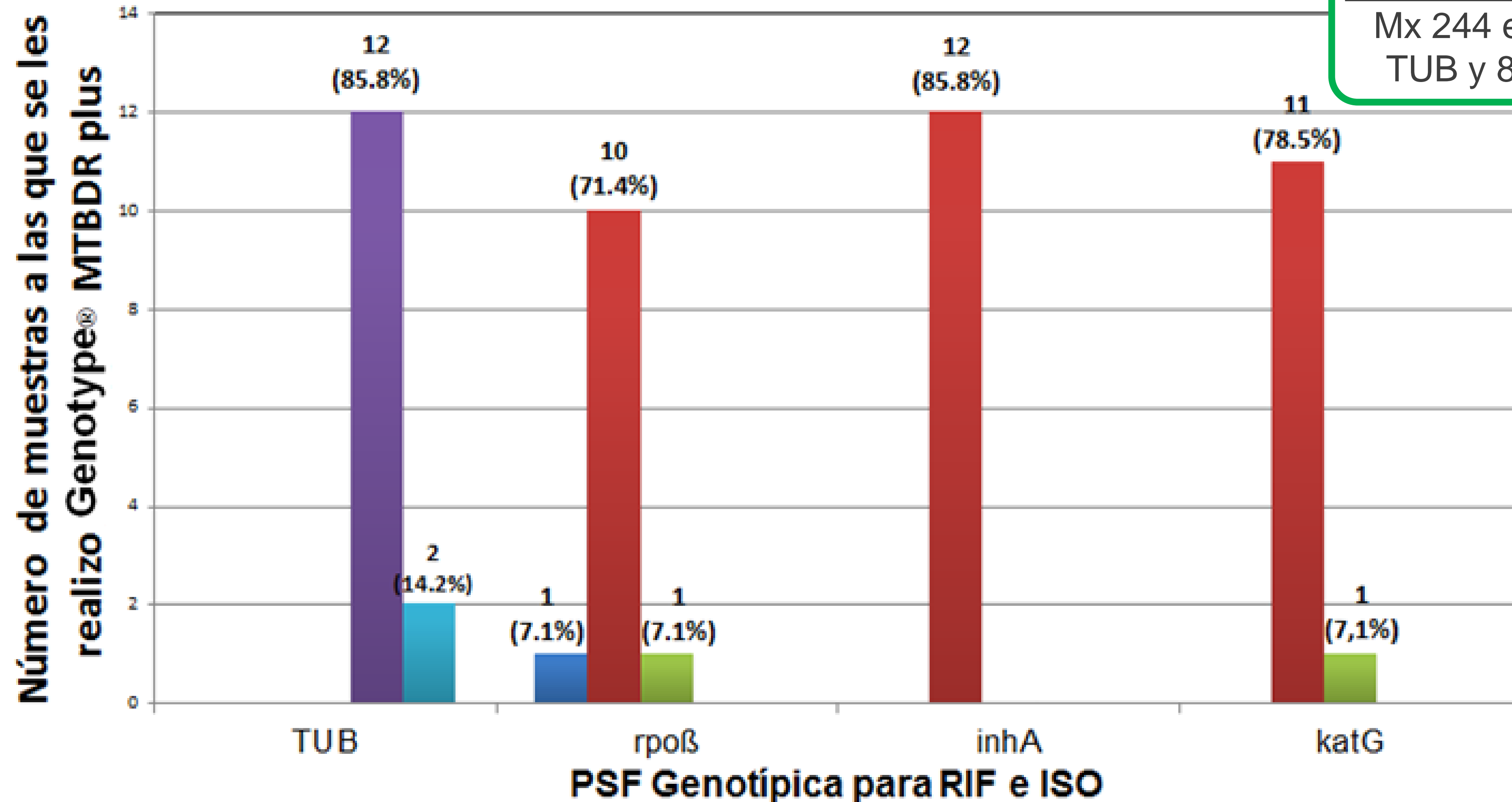


Prueba de sensibilidad Genotípica - Genotype®

MTBDR_{plus}

■ Resistente ■ Sensible ■ No interpretable ■ Amplifica ■ No amplifica

Susan E. Dorman y col, Sudáfrica, 2012:
Mx 244 esputo (+) 95% Amplificación
TUB y 81% sensibilidad a fármacos



CONCLUSIONES

- ▶ El uso del papel filtro para preservar *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de esputo durante 15 días permite la obtención de resultados en técnicas de baciloscopia, cultivo y las pruebas moleculares.
- ▶ La prueba de inmunocromatografía es un complemento para la detección del complejo *M.tuberculosis* gracias a su sensibilidad (100%), ya que el 95 al 98% de los casos reportados en Colombia corresponden a el complejo.
- ▶ Se determina que el papel filtro permite la obtención de resultados diagnósticos en baciloscopia (100%), cultivo medio liquido (92.9%), pruebas de sensibilidad fenotípicas (61.5%) y pruebas moleculares como Gentotype® MTBDRplus (85.8%) sugiriendo sus ventajas como medio de transporte para conservación y preservación de las muestras.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A Dios por su infinito amor*
- ❖ *La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, porque gracias a ella nuestros sueños son una realidad.*
- ❖ *A Nuestros familiares, amigos y maestros por su amor y apoyo incondicional.*
- ❖ *Al Instituto Nacional de Salud (INS) por acogernos en sus instalaciones y permitir adquirir experiencia y conocimiento.*
- ❖ *A nuestra Tutora, Edith Hernández Rojas, por aportar de su conocimiento.*
- ❖ *A nuestras asesoras externas, la doctora Claudia Llerena y la doctora Gloria Puerto por guiarnos con su experiencia.*
- ❖ *A todos los miembros del grupo de Micobacterias del INS por ser parte del proceso de aprendizaje.*
- ❖ *A los profesionales en los departamentos de Norte de Santander, Amazonas, Nariño y Choco, por depositar su confianza en este trabajo.*

Mutaciones y bandas wt utilizadas para la prueba de susceptibilidad genotípica

PSG	Genes	Banda	Codones analizados	Desarrollo banda de mutación	Mutación
Genotype MTBDRplus	<i>rpo β</i>	<i>rpo B</i> WT1	505-509		F505L, T508A
		<i>rpo B</i> WT2	510-513		E510H, L511P
		<i>rpo B</i> WT3	510-517		Q513L, Q513P
		<i>rpo B</i> WT4	516-522	<i>rpo B</i> MUT1	D516V, N518I
		<i>rpo B</i> WT5- WT6	518- 525		S522L, S522Q
		<i>rpo B</i> WT7	526-529	<i>rpo B</i> MUT2A - <i>rpo B</i> MUT2B	H526Y H526D
		<i>rpo B</i> WT8	530-533	<i>rpo B</i> MUT3	S531L
		KatG	<i>KatG</i> WT	315	<i>Kat G</i> MUT1
	<i>KatG</i> MUT2				S315T2
	<i>inhA</i>	<i>inhA</i> WT1	-15	<i>inhA</i> MUT1	C-15T
			-16	<i>inhA</i> MUT2	A-16G
		<i>inhA</i> WT2	-8	<i>inhA</i> MUT3A	T-8C
				<i>inhA</i> MUT3B	T-8A

Concordancia de las baciloscopias realizadas entre las IPS y el INS

DEPARTAMENTO	POSITIVIDAD DIRECTA IPS DEPARTAMENTALES			POSITIVIDAD CONCENTRADA INS		
	1+	2+	3+	1+	2+	3+
Amazonas		3			3	
Choco	2		2	2	1	1
Nariño			1			1
Norte de Santander		5	1	2	4	
Total positividad	2	8	4	<u>4</u>	8	2

Concordancia del crecimiento en cultivo medio solido LJ entre las IPS y el INS

	CULTIVO EN MEDIO SOLIDO LJ IPS			CULTIVO EN MEDIO SOLIDO LJ INS		
DEPARTAMENTO	CRECIMIENTO	SIN CRECIMIENTO	CONTAMINADO	CRECIMIENTO	SIN CRECIMIENTO	CONTAMINACION
Amazonas	3			3		
Choco	2	2			<u>4</u>	
Nariño	1			1		
Norte de Santander	3		3	<u>1</u>	3	2
Total Cultivos	9	2	3	5	7	2

	departamento	Bacilosco- pi a LSPD/INS	LJ	MGIT	GENOTYPE	PCR COMPLEJO	CROMATROGRAFIA
1	Norte de Santander	2+/1+	C	+	+	+	+
2	Norte de Santander	2+/2+	-	+	+	+	+
3	Norte de Santander	2+/1+	-	-	NO AMPLI	NO AMPLI	NO SE REALIZO
4	Norte de Santander	2+/2+	-	+	+	NO AMPLI	+
5	Norte de Santander	3+/2+	-	+	+	+	+
6	Norte de Santander	2+/1+	-	+	NO AMPLI	NO AMPLI	+
7	choco	3+/3+	C	+	+	+	+
8	choco	1+/1+	-	+	+	NO AMPLI	+
9	choco	3+/2+	-	+	+	+	+
10	choco	1+/1+	+	+	+	NO AMPLI	+
11	Nariño	3+/3+	+	+	+	+	+
12	amazonas	2+/1+	+	+	+	+	+
13	amazonas	2+/2+	+	+	+	NO AMPLI	+
14	amazonas	2+/2+	+	+	+	NO AMPLI	+