Datta S, Alvarado K, Gilman RH, Valencia T, Aparicio C, Ramos ES, Montoya R, Evans CA.
Optimización de la microscopía de esputo con diacetato de fluoresceína para evaluar pacientes con tuberculosis pulmonar
*PLoS ONE* 2019;14(4):e0214131.
Open access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31039160>

**Antecedentes:** La evaluación de la viabilidad de Mycobacterium tuberculosis (TB) mediante microscopía de diacetato de fluoresceína (FDA) puede predecir los resultados del cultivo de TB, la respuesta al tratamiento y la infecciosidad. Sin embargo, se han publicado diversos métodos. Nuestro objetivo era optimizar la microscopía de la FDA, minimizando el procesamiento de esputo, el riesgo biológico y la complejidad para su uso en entornos con recursos limitados.

**Métodos y resultados:** Optimización: los pacientes con tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva antes del tratamiento y los participantes de control sanos proporcionaron esputa. Estos se dividieron en partes alícuotas iguales que se probaron directamente o después de la descontaminación por centrifugación de NaOH. Cada alícuota se cultivó y se usó para preparar portaobjetos (n = 80). Microscopía de la FDA utilizada: 1 o 3 gotas de esputo; con / sin lavado ácido-alcohol; sin esterilización con fenol; con 0/30/60 segundos de enfriamiento KMnO4. Todas las muestras de control tuvieron resultados negativos de cultivo y microscopía. La microscopía de la FDA tuvo una mayor sensibilidad cuando se realizó directamente (sin descontaminación centrífuga) en 1 gota de esputo (P <0.001), porque 3 gotas de microscopía oscurecida. El lavado con alcohol ácido y el enfriamiento con KMnO4 hicieron que los bacilos fueran más fáciles de identificar (P = 0.005). La esterilización con fenol no perjudicó la microscopía (P> 0.1). Validación: Los 2 protocolos que se desempeñaron mejor en los experimentos de optimización se reevaluaron operativamente comparando diapositivas duplicadas (n = 412) teñidas con temple de KMnO4 durante 30 versus 60 segundos. Los resultados de microscopía de la FDA fueron similares (P = 0,4) y altamente reproducibles, con un 97% de recuentos de acuerdo con +/- 1 logaritmo. Almacenamiento: los portaobjetos de microscopía de frotis y las alícuotas del esputo del que se hicieron se almacenaron durante 4 semanas. Las diapositivas emparejadas dos veces por semana (n = 80) se tiñeron con FDA recién preparada versus almacenada y se leyeron cuantitativamente. El almacenamiento de esputo, portaobjetos de microscopía o solución de la FDA a 4 ° C o temperatura ambiente no tuvo ningún efecto en los resultados de la microscopía de la FDA (todos P> 0.2). Costo: los costos de material para cada portaobjetos probado por microscopía de la FDA utilizando reactivos comprados localmente fueron de USD $ 0.05 y requirieron el mismo equipo, tiempo y habilidades que la microscopía de ácido auramina.

**Conclusiones:** Recomendamos un protocolo simple y bio-seguro para microscopía de la FDA que proporcione resultados sensibles y repetibles sin requerir centrifugación.