



NORMAS Y GUÍA TÉCNICA

MANUAL

PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO
DE LA TUBERCULOSIS



PARTE 1 Baciloscopia



MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

NORMAS Y GUÍA TÉCNICA

PARTE I BACILOSCOPIA



**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud

2008

Redacción

María Delfina Sequeira de Latini
INER, ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Argentina

Lucía Barrera
INEI, ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Argentina

Revisión técnica

Susana Balandrano
InDRE, México

María Cecilia Riquelme y Maritza Velazco
INS, Chile

Ernesto Montoro
IPK, Cuba

María Consuelo Garzón Torres
INS, Colombia

Revisión especial de expertos

Isabel Narvaiz de Kantor
Adalberto Laszlo

INTRODUCCIÓN	7
LA MUESTRA	11
EL ESPUTO	11
El envase	11
Número de muestras y momento de la recolección	12
Para diagnóstico.....	12
Para control de tratamiento	12
Para organizar la internación de pacientes	12
Obtención espontánea del esputo.....	13
Calidad de la muestra.....	13
Métodos especiales para obtener muestras de esputo	14
Inducción de esputo	14
Lavado gástrico	14
Lavado bronquial	15
OTRAS MUESTRAS.....	15
Orina	15
Líquido cefalorraquídeo	16
Líquidos pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros	16
Biopsias y material resecado	16
Pus	16
Sangre	17
RECEPCION, CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	19
<i>Recepción de los pacientes.....</i>	<i>19</i>
<i>Conservación.....</i>	<i>20</i>
<i>Transporte</i>	<i>20</i>
<i>Recepción en el laboratorio que hace la baciloscopia</i>	<i>21</i>
<i>Encauzar para cultivo</i>	<i>21</i>

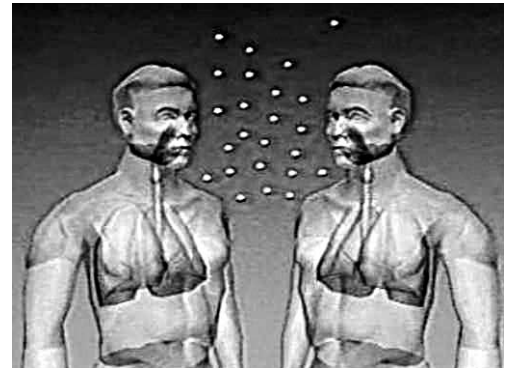
LA BACILOSCOPIA	23
<i>LUGAR DE TRABAJO Y MATERIALES</i>	<i>23</i>
<i>PREPARACIÓN Y FIJACIÓN DEL EXTENDIDO</i>	<i>25</i>
<i>TINCIÓN</i>	<i>28</i>
La técnica de Ziehl Neelsen.....	28
Coloración	28
Decoloración.....	28
Coloración de fondo	28
Tinción fluorescente	30
<i>OBSERVACION MICROSCÓPICA Y LECTURA DE EXTENDIDOS</i>	<i>30</i>
Características morfológicas del bacilo de la tuberculosis	30
Lectura de extendidos coloreados por Ziehl Neelsen	31
Lectura de frotis coloreados con fluorocromos	33
Procedimientos a seguir frente al hallazgo menos de 5 BAAR en 100 campos observados.....	33
<i>INFORME DE LOS RESULTADOS</i>	<i>33</i>
<i>DECONTAMINACION Y DESECHO DEL MATERIAL</i>	<i>34</i>
<i>DERIVACIÓN DE MUESTRAS PARA CULTIVO</i>	<i>34</i>
SISTEMA DE REGISTROS.....	37
CONTROL DE CALIDAD DE LAS BACILOSCOPIAS	39
<i>CONTROL DE CALIDAD INTERNO</i>	<i>39</i>
Causas de error en la microscopía.....	40
Control de colorantes y microscopios.....	40
Control de registros e indicadores de calidad de trabajo.....	41
<i>CONTROL DE CALIDAD EXTERNO.....</i>	<i>42</i>
De láminas.....	42
Operacional.....	42
BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA.....	43
ANEXOS	
<i>ANEXO I: NORMAS MINIMAS DE BIOSEGURIDAD</i>	<i>47</i>
Información y control médico del personal de laboratorio.....	47
Precauciones generales de trabajo	48
Precauciones en la toma y manipulación de las muestras.....	49

Manipulación y uso de desinfectantes	49
Manipulación de otras sustancias químicas	50
Procedimientos frente a un accidente de trabajo.....	50
ANEXO II: PREPARACIÓN DE COLORANTES Y REACTIVOS.....	51
PARA LA TECNICA DE ZIEHL NEELSEN.....	51
Fucsina básica fenicada.....	51
Solución decolorante	51
Azul de metileno	52
PARA LA TINCION FLUORESCENTE.....	53
Solución de Auramina-O	53
Solución decolorante	53
Colorantes de contraste.....	53
Solución de Permanganato de potasio.....	53
Solución de naranja de acridina	53
PRECAUCIONES	53
USO Y MANTENIMIENTO DE LA BALANZA	54
CÁLCULO DE STOCK DE REACTIVOS.....	54
ANEXO III: EL MICROSCOPIO.....	57
COMPONENTES	57
Parte mecánica.....	57
Elementos ópticos y de iluminación	57
MANEJO	58
Centrado de la iluminación	58
Enfoque y control de la limpieza	58
CUIDADOS	59
ANEXO IV: MODELOS DE FORMULARIOS	60
SOLICITUD DE BACILOSCOPIA DE ESPUTO	60
REGISTRO DE LA BACILOSCOPIA	60
REGISTRO DE LABORATORIO DE TUBERCULOSIS	61
CONTROL DE CALIDAD INTERNO	62
CONTROL DE CALIDAD EXTERNO	63
PEDIDO TRIMESTRAL DE SUMINISTROS DE LABORATORIO.....	64

INTRODUCCIÓN

Se estima que alrededor de un tercio de la población mundial, dos mil millones de personas, están infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*, bacilo causante de la tuberculosis; aproximadamente 8 millones de ellos enferman anualmente y cerca de dos millones mueren por la enfermedad, aún cuando se cuenta con técnicas de diagnóstico sencillas y precisas y tratamientos eficaces.

La transmisión de los bacilos de la tuberculosis se produce casi exclusivamente por medio de núcleos suspendidos en pequeñas gotas que son expulsadas con la expectoración de las personas afectadas por tuberculosis pulmonar. Estas pequeñas gotas pueden permanecer infectantes en el aire durante bastante tiempo y pueden ser inhaladas por otras personas. La infección de los contactos es más probable cuando conviven o permanecen durante un tiempo prolongado cerca del enfermo que está expectorando bacilos y en un ambiente poco ventilado.



**Cuanto mayor es el número de enfermos
que están expectorando bacilos en la comunidad,
mayor es la diseminación de la tuberculosis.
La identificación de los casos infecciosos
es el principio de solución del problema para los enfermos
y, fundamentalmente, para este problema de salud pública**

No todas las personas infectadas enferman, sólo una de cada diez aproximadamente, que son las más susceptibles. La tuberculosis puede manifestarse en cualquier órgano, porque *M.tuberculosis* se disemina por todo el organismo; sin embargo, la enfermedad pulmonar es la más frecuente (80-85% de todos los casos diagnosticados) debido a que el bacilo necesita abundante oxígeno para multiplicarse. En los pulmones de los enfermos se pueden formar cavidades en las que se alojan grandes poblaciones de bacilos que pueden ser detectados en muestras de esputos. Los síntomas más característicos de la tuberculosis pulmonar son la tos y la expectoración persistentes por más de 2 semanas. A las personas con estos síntomas se los llama Sintomáticos Respiratorios (SR). Otras manifestaciones pueden ser pérdida de peso, febrícula, sudores nocturnos, cansancio físico y dolores de tórax.

El diagnóstico de certeza de tuberculosis puede hacerse en forma confiable en el laboratorio

demostrando la presencia de bacilos en una muestra de la lesión por medio de la baciloscopia (examen microscópico) o el cultivo.

Para que la baciloscopia sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo, entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra. Este alto contenido de bacilos se encuentra en los pacientes con tuberculosis pulmonar, especialmente en aquellos con enfermedad avanzada y con lesiones cavitadas. Estos pacientes son los que transmiten los bacilos manteniendo la enfermedad en la comunidad.

El Programa de Control de Tuberculosis tiene como objetivo principal cortar la cadena de transmisión, diagnosticando tempranamente los casos infectantes

y tratándolos con esquemas eficaces hasta lograr su curación. La estrategia recomendada internacionalmente para alcanzar este objetivo es la del tratamiento abreviado estrictamente supervisado, TAES o DOTS, según se utilice sus siglas en castellano o en inglés respectivamente. Esta estrategia requiere el compromiso político para asegurar los recursos para controlar la tuberculosis, el acceso a la baciloscopia con calidad asegurada para la detección de casos, el control de la evolución de los pacientes, el acceso y disponibilidad ininterrumpidos de las drogas que integran los esquemas estandarizados de tratamiento para curar a los enfermos, y un sistema de registros e información que permita evaluar el resultado de los tratamientos y el desempeño del Programa de Control.

**La baciloscopia es la técnica de elección para el diagnóstico rápido
y el control del tratamiento de la tuberculosis pulmonar del adulto.
Es simple, económica y eficiente para detectar los casos infecciosos.
Por eso es la herramienta fundamental
de un programa de control de la tuberculosis**

Es necesario contar con suficientes laboratorios que aseguren a los enfermos un diagnóstico oportuno, preciso y accesible. Los servicios de laboratorio son mas eficientes y potentes cuando se integran en una Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis que debe involucrar a laboratorios del sistema de salud pública de todas las jurisdicciones incluyendo a los que prestan servicios a prisiones, a los del sistema de seguro de salud, a los del sistema de salud privado y los de organizaciones no gubernamentales. La conducción de esta red debe estar integrada en el nivel de programación y decisión del PNCT el que, a su vez, debe hacer las gestiones necesarias para sostener la organización y el funcionamiento de esta red.

Todos los componentes de la red tienen responsabilidad y se complementan para asegurar el acceso al diagnóstico rápido y confiable por baciloscopia. Todas las unidades de salud deben recibir muestras de los SR que deben ser investigados. Los laboratorios de centros de atención primaria de la salud deben, además, realizar la

baciloscopia e integrarse a los programas de garantía de calidad. Los laboratorios intermedios agregan entre sus responsabilidades la de entrenar al personal de los laboratorios de su jurisdicción y la de asegurar en ellos la calidad de la baciloscopia. Los laboratorios centrales o de referencia nacional deben ser capaces de organizar la garantía de calidad en todo el país, mantener bajo evaluación la oferta y realización de baciloscopias, proveer herramientas para el entrenamiento del personal de laboratorio de todos los niveles, planificar y gestionar el suministro de los insumos cuya adquisición centralizada sea conveniente. El resto de los componentes del PNCT debe sumarse utilizando adecuadamente la oferta de baciloscopias y los resultados producidos por la red de laboratorios

Para que la baciloscopia sea una buena herramienta de control no es suficiente la calidad técnica. También es necesaria la calidad de los registros, de los informes del laboratorio y el análisis de la información que produce el laboratorio.

La estandarización de los procedimientos involucrados en la baciloscopia se basa en normas técnicas que son el producto de amplia experiencia, periódicamente revisada por organizaciones internacionales como la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER).

El primer Manual de Microscopía de Tuberculosis puesto en vigencia por OPS para Latinoamérica fue escrito por el Dr. Luis Herrera Malmsten, Jefe del Departamento Tuberculosis del Instituto Bacteriológico de Chile, revisado y aprobado por un Comité Asesor en Bacteriología de Tuberculosis y publicado como documento CD/TB-ST/LAB en 1973. Ese Manual fue utilizado hasta que, en 1983 un Comité Asesor de la OPS/OMS, actualizó las normas en la Nota Técnica CEPANZO (OPS/OMS)

Nº 26. El comité estuvo integrado por los Dres Lamberto Blancarte del Laboratorio Central de Tuberculosis de México, Omar Latini del Instituto Nacional de Epidemiología de Argentina, Adalbert Laszlo del Center for Disease Control de Canadá y Pedro Valenzuela del Instituto de Salud Pública de Chile y trabajó bajo la coordinación de los Dres. Isabel N. de Kantor y Álvaro Yáñez de la Organización Panamericana de la Salud.

Si bien el progreso de la tecnología ha impulsado innovaciones en la bacteriología, la baciloscopia no ha sido objeto de modificaciones técnicas sustanciales. Sin embargo, nuevas situaciones epidemiológicas, especialmente la incidencia de tuberculosis entre personas que viven con HIV y la necesidad de garantizar con mayor rigor la calidad de los resultados y la seguridad de las personas y el medio ambiente, han impulsado una nueva actualización de las normas en la presente edición.

Para que el laboratorio pueda obtener resultados confiables no sólo es necesario que ejecute las técnicas correctamente. También necesita recibir una buena muestra, entendiéndose por tal la que proviene del sitio de la lesión que se investiga, obtenida en cantidad suficiente, colocada en un envase adecuado, bien identificada, conservada y transportada.

La muestra más examinada es el esputo debido a que, como se ha dicho, la tuberculosis pulmonar es la más frecuente. Sin embargo, dado que la enfermedad puede manifestarse en cualquier órgano, con menor frecuencia puede requerirse la investigación de muestras muy variadas: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, sangre, pus de cavidades abiertas, biopsias. Estas muestras de lesiones extrapulmonares deben procesarse también por cultivo.

EL ESPUTO

El envase

Debe tener las siguientes características:

- **Boca ancha:** de no menos de 50 mm de diámetro
- **Capacidad entre 30 y 50 ml:** para facilitar que el paciente pueda depositar la expectoración con facilidad dentro, sin ensuciar sus manos o las paredes del frasco y para que en el laboratorio se pueda seleccionar y tomar la partícula más adecuada, con comodidad, para realizar el extendido.
- **Cierre hermético:** con tapa a rosca, para evitar derrames durante el transporte y la producción de aerosoles cuando se abre en el laboratorio. Las tapas a presión generan mayor riesgo de formación de aerosoles y salpicaduras en el momento de ser retiradas
- **Material plástico transparente, resistente a roturas,** para poder observar la calidad de la muestra cuando la entrega el SR, evitar roturas y derrames de material infeccioso y para que pueda ser desechado. No se recomienda lavar y reutilizar frascos de vidrio, para evitar posibles errores en la baciloscopia originados en la transferencia de material de una muestra a otra y minimizar la manipulación de material potencialmente infeccioso.



Número de muestras y momento de la recolección

Para diagnóstico

Como la eliminación de los bacilos por el esputo no es constante, es conveniente analizar más de una muestra de cada SR para el diagnóstico de la tuberculosis. La primera muestra puede detectar aproximadamente el 80% de los casos positivos, la segunda agrega un 15% y la tercera un 5% más.

Las normas de los PNCT recomiendan la obtención de dos o tres muestras por SR, para que la probabilidad de detección de bacilos sea la máxima posible.

La **primera muestra debe ser tomada en el momento de la consulta** (muestra inmediata), cuando el médico u otro personal del equipo identifica que un consultante al servicio de salud es SR (es decir con tos persistente durante 2-3 semanas) La segunda muestra la debe recolectar el paciente en su casa por la mañana al despertar (muestra matinal). La tercera muestra, cuando sea requerida, puede ser tomada en el servicio de salud, cuando el paciente concurre a entregar la segunda. También puede ser recolectada por el paciente al despertar en su casa.

La obtención de la muestra en el momento de la consulta inicial asegura que se pueda realizar al menos una baciloscopia del SR. Sin embargo, es más probable que se eliminen bacilos en las muestras matinales, por lo que deben hacerse los mayores esfuerzos para que la persona regrese con otra(s) muestra(s).

Para control de tratamiento

El tratamiento de la tuberculosis comprende dos fases: una inicial intensiva que dura entre 2 y 3 meses y otra de consolidación que dura de 4 a 5 meses, dependiendo de la categoría del paciente y del esquema adoptado por el PNCT.

La disminución paulatina y sostenida en la escala de positividad hasta la negativización de la baciloscopia evidencia buena evolución del paciente

Independientemente del esquema, se aconseja examinar por baciloscopia una muestra por mes de cada paciente de tuberculosis pulmonar con baciloscopia inicial positiva. Si esto no es posible, se debe examinar por lo menos una muestra MATINAL al final de la fase intensiva. Si la baciloscopia es negativa, coincidiendo con mejoría clínica y cumplimiento del tratamiento, se pasa a la segunda fase de tratamiento. Si por el contrario, la baciloscopia continúa positiva, será enviada para cultivo para el caso en que se requiera prueba de sensibilidad y se evaluará si el paciente puede pasar a la fase de continuación o si debe extenderse la primera fase.

Luego se debe tomar al menos otra muestra para microscopía al finalizar el 4º mes para controlar la evolución del paciente y detectar un posible fracaso del tratamiento, y una al finalizar el tratamiento para confirmar la curación.

La detección del fracaso de tratamiento es más seguro cuando se basa en reiterados resultados positivos de baciloscopias en sucesivas muestras del paciente. Algunos pacientes que inician su tratamiento con baciloscopia altamente positiva y están respondiendo bien al tratamiento pueden seguir presentando baciloscopia positiva al finalizar la fase intensiva, aunque con menor grado de positividad. Es posible también que expectoren bacilos muertos que son vistos en el examen microscópico. El cultivo permite determinar si son bacilos vivos o no viables (no cultivables o muertos). Si la mayor parte o todos los bacilos vistos son no viables, el cultivo presentará escasas colonias o será negativo, a pesar de la baciloscopia positiva y esto coincidirá con una evolución clínica favorable.

Para organizar la internación de pacientes

Para evitar la transmisión de tuberculosis intrahospitalaria el paciente bacilífero que, excepcionalmente, requiera ser internado deberá permanecer en aislamiento hasta que la baciloscopia de tres muestras de esputo tomadas en días sucesivos resulte negativa. En este caso es recomendable evaluar al paciente con baciloscopias de esputo semanales desde el momento en que la positividad es categorizada como una cruz, para

detectar oportunamente la negativización y permitir que el aislamiento finalice lo antes posible.

Obtención espontánea del esputo

El primer paso para asegurar la calidad de la baciloscopia consiste en explicar al SR, con mucha claridad, la importancia de examinar muestras de esputo, la necesidad de recolectar esputo y no saliva, la forma de lograr una buena muestra, dónde colectarla y cómo manipularla hasta entregarla en el laboratorio

Para la recolección de las muestras

- elegir un lugar bien ventilado y que ofrezca privacidad. Puede ser una habitación bien ventilada y con acceso de luz natural (sol) o algún lugar abierto no concurrido del patio del Servicio de Salud. Son inadecuados los lugares cerrados o muy concurridos tales como laboratorios, consultorios médicos, salas de espera o baños, ya que éste es el proceso más riesgoso entre todos los necesarios para realizar la baciloscopia.
- entregar al SR el envase de recolección ya rotulado con su nombre o número de identificación y el servicio que solicita la baciloscopia. Estos datos deben ser escritos en la pared del frasco y no en la tapa para evitar errores, con rótulos que no se despeguen o con lápiz indeleble.
- solicitar al SR una buena muestra de esputo utilizando la palabra que lo identifica en cada lugar (gallo, pollo, gargajo, del fondo del pecho, etc), instruyéndolo con



lenguaje simple y comprensible para que

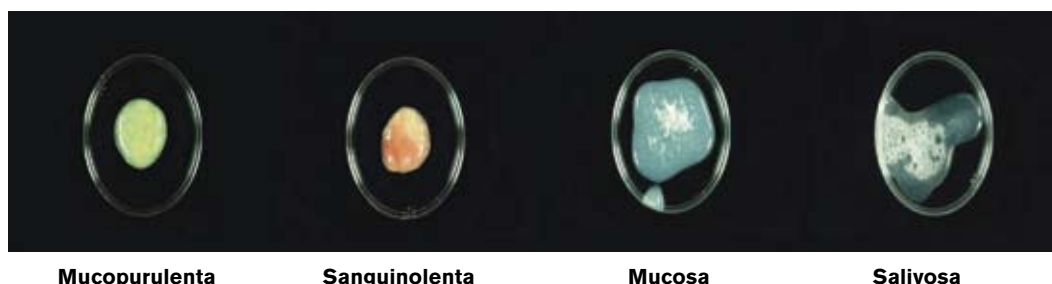
- inspire profundamente llenando sus pulmones de aire tanto como sea posible
- retenga el aire un momento
- expulse luego la expectoración con un esfuerzo de tos, tratando de arrastrar las secreciones del pulmón
- recoja el esputo producido dentro del envase tratando de que entre en su totalidad, sin manchar sus manos o las paredes externas del frasco
- repita esta operación otras dos veces colocando todas las secreciones en el mismo frasco
- limpie el exterior del envase con un pañuelo de papel y se lave las manos con agua y jabón



Calidad de la muestra

La muestra de esputo mucopurulenta, proveniente de árbol bronquial, es la que asegura mayor probabilidad de que se puedan observar bacilos

Una buena muestra tiene aproximadamente 3 a 5ml, es generalmente espesa y mucoide. Puede ser fluida con partículas de material purulento. El color es variable (blanco, amarillento y hasta verdoso). A veces son sanguinolentas. Las secreciones nasales, faríngeas o la saliva no son buenas muestras para investigar tuberculosis, aunque es conveniente examinarlas, de todas formas, porque siempre existe la posibilidad de que contengan parte de la expectoración o bacilos expulsados por la tos que hayan quedado en la boca, nariz o faringe.



Mucopurulenta

Sanguinolenta

Mucosa

Salivosa

Métodos especiales para obtener muestras de esputo

Siempre se debe intentar conseguir expectoración espontánea porque produce la muestra con mayor riqueza en bacilos. Frente a determinados pacientes que no pueden expectorar, como en el caso de niños, enfermos psiquiátricos o ancianos, se puede recurrir a otras formas menos eficientes de obtención de la muestra tales como la inducción de esputo o el lavado gástrico. Estos procedimientos requieren equipo y medidas especiales de bioseguridad, y deben ser efectuadas por personal experimentado.

Inducción de esputo

Consiste en fluidificar las secreciones mediante nebulización con solución fisiológica y facilitar luego su drenaje. El procedimiento requiere de personal muy bien entrenado y, en el caso de aplicar masaje y sondas, muy especializado. Implica riesgo elevado para el personal que asiste al paciente, por lo que debe ser utilizado sólo cuando no queda otro recurso.

- Realizar el procedimiento en la sala de toma de muestras u otra con buena ventilación.
- Usar mascarillas de bioseguridad (respiradores n 95) desechables.
- Nebulizar (hacer inhalar) al paciente durante 10 minutos con solución fisiológica, a temperatura apenas superior a la corporal.
- Para facilitar la expulsión de la expectoración, puede ser conveniente acostar al paciente boca abajo con una almohada debajo del tórax y la cabeza saliendo de la camilla y más baja y, si es posible, masajearlo con técnicas fisioterapéuticas
- Se puede repetir el proceso hasta tres veces.
- Recolectar la primera expectoración producida.
- Entregar un segundo frasco para que la persona recoja las secreciones producidas en las 24 horas siguientes.
- Descartar las máscaras
- Esterilizar el material empleado, y luego lavarlo con detergente y abundante agua.
- Ventilar el ambiente inmediatamente después de la toma de cada muestra.

Cuando se trata de niños que no saben expectorar, luego de la nebulización y el masaje fisioterápico, se deben succionar las secreciones con un aspirador manual o mecánico. Para la operación manual pueden utilizarse aspiradores de secreciones o colocarle al niño, sólo hasta la nasofaringe, una sonda nasogástrica K30 humedecida y conectada a una jeringa para aspirar con ella. Para la aspiración mecánica, se coloca la sonda nasogástrica K30 de la misma forma y se la conecta a una tubuladura (del tipo de las usadas para perfundir soluciones) y se aspiran las secreciones con un aspirador eléctrico, con la mayor suavidad posible. Las secreciones quedarán retenidas en la ampolla de la tubuladura.

El material recolectado debe ser examinado por baciloscopia y cultivo aunque no sea mucoso.

Lavado gástrico

Se emplea especialmente en niños que no saben expectorar para detectar bacilos en el esputo ingerido, mientras se encuentran en el estómago. La baciloscopia de lavado gástrico tiene valor relativo. Por un lado los pacientes infantiles presentan lesiones que contienen pocos bacilos y por lo tanto es poco probable detectarlos. Por otro, es posible que la muestra contenga micobacterias ambientales provenientes de alimentos que pueden inducir a resultados falsos positivos.

Se recomienda utilizar esta muestra sólo para diagnóstico y no en el control del tratamiento.

Estas muestras deben ser obtenidas por personal de enfermería experimentado, o por médicos. Para evitar demoras en el procesamiento, la toma de estas muestras debe ser programada en conjunto con el personal del laboratorio

Se deben respetar las siguientes recomendaciones:

- Número de muestras: al menos tres.
- Envase: el aconsejado para esputo.
- Momento de la recolección: por la mañana al despertar, en ayunas dado que la ingesta de alimentos hace que la expectoración ingerida

pase al intestino. El ayuno no debe ser demasiado prolongado y no debe haber estímulo alimenticio que aumente la acidez gástrica (por ejemplo por presencia de la madre ante los lactantes),

- Técnica: Se introduce una sonda de longitud y diámetro adecuados a la edad del paciente hasta el estómago. Una vez que la sonda llega al estómago, se aspira con jeringa muy suavemente para que la succión no provoque daño. En caso de no obtenerse material, se inoculan 10 a 15 ml de agua destilada o solución fisiológica estéril y se recoge el contenido gástrico inmediatamente después, en un frasco de tamaño adecuado.
- Conservación: El material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio, ya que debe ser cultivado durante las 4 horas siguientes a su obtención. Si, excepcionalmente, no es posible el procesamiento inmediato debe neutralizarse el material con 1 mg de bicarbonato de sodio o de fosfato trisódico anhidro por cada ml de contenido gástrico, y conservarse en heladera por no más de 24 horas.
- Procesamiento: las muestras de lavado gástrico deben cultivarse. La baciloscoopia se realiza con el sedimento de la muestra centrifugada previamente durante 30 minutos a 3.000 g, por lo que es conveniente que sea hecha directamente en el laboratorio que cultiva la muestra.

Lavado bronquial

Antes de tomar la muestra deben realizarse, de ser posible, baciloscopias de al menos dos muestras espontáneas de esputo para intentar detectar el bacilo sin procedimientos invasivos y los riesgos vinculados a este procedimiento.

La obtención de esta muestra está reservada a médicos especialistas. Se deben respetar las siguientes recomendaciones

- Tomar la muestra en una sala bien ventilada y utilizando mascarillas de bioseguridad.
- Utilizar un fibrobroncoscopio esterilizado no mas de 15 días antes
- Entregar al paciente un frasco para que recoja toda la expectoración que por estímulo de la fibrobroncos-

copía se puede producir en las 24 horas siguientes

- Esterilizar rigurosamente el fibrobroncoscopio con glutaraldehído al 2% activado con una sustancia bicarbonatada, según las indicaciones del proveedor.
- Después de la esterilización, lavar el fibrobroncoscopio enérgicamente para desprender bacilos que puedan haber quedado adheridos

Si el fibrobroncoscopio no es debidamente esterilizado, puede ser vehículo de transmisión de tuberculosis. Si, además, no es apropiadamente lavado también puede originar falsos resultados positivos por la presencia de bacilos remanentes, vivos o muertos.

El material obtenido debe ser cultivado para asegurar el mejor rendimiento posible de esta muestra de difícil obtención y para confirmar la presencia de bacilos viables en el caso de tener un resultado positivo de la baciloscoopia.

OTRAS MUESTRAS

Todas las muestras extrapulmonares deben cultivarse: en algunos casos porque la escasa cantidad de bacilos de la tuberculosis presentes sólo podrá ser detectada por cultivo, en otros para confirmar o descartar que la muestra contenga micobacterias ambientales saprofitas (como en el caso de la orina que resulta con baciloscoopia positiva) o, excepcionalmente patógenas.

La baciloscoopia de los líquidos con volumen mayor a 1 ml debe ser realizada luego de centrifugarlos 15 minutos a 3000 g, y la de tejidos después de disgregar el material. Por esta razón es altamente recomendable que la baciloscoopia de estas muestras sea realizada en el mismo laboratorio que cultivará la muestra.

Orina

- Número de muestras: mínimo tres y máximo seis.
- Cantidad y momento de recolección: previa higiene externa con agua, el paciente debe recoger no menos de 50 ml del segundo chorro de la primera micción de la mañana. Se desecha la primera parte para disminuir la carga de gérmenes contaminantes.

- Envase: de 300-500 ml, limpio y de boca suficientemente ancha para posibilitar la recolección directa.
- Conservación: la muestra debe ser procesada inmediatamente porque el pH ácido afecta la viabilidad del bacilo. Si se debe transportar hasta otro laboratorio, se recomienda enviar el sedimento de toda la orina centrifugada durante 15 minutos a 3.000 g, neutralizado con 1 mg de bicarbonato de sodio o fosfato trisódico anhidro y, si es necesario, conservado entre 4 y 9°C por no más de 12 horas hasta el momento del envío.

Debe recordarse que la baciloscopia positiva del sedimento de orina no necesariamente es diagnóstico concluyente de tuberculosis, por cuanto existen micobacterias saprófitas en el tracto urinario que pueden producir resultados falsos positivos. El diagnóstico debe ser completado con cultivo e identificación del bacilo observado.

Líquido cefalorraquídeo

La obtención de este material está reservada a personal médico.

- Cantidad de muestras: todas las que el médico crea conveniente; cuanto mayor es la cantidad de muestras procesadas, mayor es la posibilidad de hallazgo de bacilos.
- Envase: estéril de 10-15 ml de capacidad y con tapa a rosca de cierre hermético.
- Uso de anticoagulante: no es necesario
- Conservación: es conveniente procesar el material inmediatamente o conservado a 4° C por no más de 12 horas.

Líquidos pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros

La obtención de estos materiales está reservada al personal médico.

- Número de muestras: todas las que el médico considere conveniente
- Envase: estéril, de capacidad adecuada para la cantidad de la muestra

- Uso de anticoagulante: puede agregarse tres gotas de citrato de sodio al 10% o EDTA (ácido etilén diamino tetraacético) por cada 10 ml de muestra.
- Conservación: enviar lo más rápido posible al laboratorio que realizará el cultivo, eventualmente conservar en refrigeración por no más de 12 horas.

Toda vez que se tomen muestras de líquido pleural para investigación de adenosina deaminasa (ADA), se debe aprovechar la oportunidad de investigar por baciloscopia y cultivo el precipitado de la muestra.

Biopsias y material resecado

La obtención de estos materiales está reservada al personal médico.

En el caso de biopsia de endometrio, la muestra debe consistir preferentemente en raspado uterino tomado durante la primera fase del ciclo menstrual o en el período de ovulación.

- Envase: estéril
- Conservantes: uno o dos mililitros de solución fisiológica o agua destilada estéril para evitar la desecación. **No agregar formol** porque es letal para el bacilo, la porción de la muestra reservada para el estudio histopatológico debe ser separada para ser preservada en formol al 10%.
- Conservación: el material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio para su cultivo o ser conservado refrigerado y al abrigo de la luz hasta su envío.

Pus

- Envase: estéril Es preferible no usar hisopos para evitar la desecación. En caso de utilizarlos, antes de la toma de muestra deben ser humedecidos con solución fisiológica o agua destilada estéril.
- Conservación: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio que hace el cultivo o ser conservado refrigerado y al abrigo de la luz hasta su envío

Sangre

La investigación de sangre está indicada para pacientes con inmunosupresión severa, como en casos con infección por HIV con bajo recuento de linfocitos totales o CD₄, y con baciloscopias de muestras respiratorias reiteradamente negativas.

- Cantidad y momento de recolección: dos muestras de 10 ml de sangre venosa en días consecutivos.
- Esterilidad y bioseguridad: utilizar guantes, desinfectar previamente la piel del área donde se efectuará la extracción con alcohol iodado.
- Anticoagulantes: utilizar jeringas con heparina.
- Envase: transferir la sangre a un tubo plástico seco estéril con tapa a rosca de cierre hermético.
- Conservación: Si no puede ser enviada la muestra inmediatamente al laboratorio que la procesará, colocar la sangre recién extraída en un frasco-ampolla conteniendo 50 ml de medio de cultivo para sangre (caldo cerebro-corazón (BHI) con anticoagulante). Incubar a 37° C hasta el momento del envío al laboratorio.

RECEPCION, CONSERVACION Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

RECEPCIÓN DE LOS PACIENTES

La recepción de los pacientes que entregan sus muestras debe ser organizada en un lugar de la unidad de salud ventilado o donde el aire sea renovado por algún sistema. Debe ser ágil de tal manera que el paciente no espere. Debe tenerse en cuenta que la permanencia prolongada de pacientes que están expectorando bacilos en una sala de espera genera riesgo de transmisión de la tuberculosis en el centro de salud a otros pacientes y al personal.

Para facilitar la identificación oportuna de los casos de tuberculosis las muestras de esputo producidas por los SR deben poder ser colectadas y entregadas en cualquier hora del día, en el momento más adecuado para el paciente mientras el centro de salud esté abierto.

El laboratorio debe recibir las muestras durante toda la jornada de atención a los pacientes. Luego puede regular el momento en que las procesa ya que el esputo puede conservarse unos días, sobre todo si sólo va a ser examinado por baciloscopia. Aún así, el examen debe ser realizado con la mayor premura posible, dentro de una rutina lógica de trabajo,

En el momento de recibir la muestra, se deben completar los siguientes procedimientos:

- Comprobar que los envases de las muestras estén claramente identificados en la pared y no en la tapa y cerrados herméticamente.
- Verificar que estén acompañados por el formulario de solicitud de baciloscopia.
- Observar la calidad de la muestra a través de las paredes del envase, sin abrirlo. Si se trata de **saliva o secreción nasal es conveniente recibirla** porque, aun cuando no sea una muestra de buena calidad, puede contener bacilos. Registrar que es saliva en el formulario. Insistir en las instrucciones indicando al paciente que recoja otra muestra.
- Ubicar los envases dentro de cajas de plástico con tapa que pueda ser descontaminadas con solución de hipoclorito de sodio.



Si el paciente no obtuvo esputo y devuelve el envase, también ubicar el envase dentro de la caja para que luego sea desechado con el material contaminado como si hubiera sido usado

Después de recibida la muestra es necesario agilizar los procedimientos en todo lo posible. Cuanto antes se procese, mayor será la posibilidad de encontrar en ella *M. tuberculosis* por baciloscopia o cultivo. La temperatura ambiente y el transcurso del tiempo favorecen la multiplicación de los gérmenes habituales del árbol respiratorio y de la boca que desnaturalizan las proteínas del esputo, dificultan la elección de la partícula útil y favorecen la destrucción del bacilo. La multiplicación de la flora habitual o contaminante de las muestras de orina o contenido gástrico aumenta la posibilidad de que el cultivo resulte contaminado.

CONSERVACIÓN

Si las muestras de esputo no van a ser procesadas en el día, es aconsejable introducir cada envase en una bolsa de polietileno y anudar la bolsa encima de la tapa, de manera que quede sujeta firmemente. Las muestras deben ser conservadas en refrigerador, preferentemente dentro de la caja de plástico. Si no se cuenta con refrigerador, ubicarlas en un lugar fresco y protegidas de la luz.

Si las muestras van a ser procesadas sólo por baciloscopia y deben inevitablemente ser conservadas por varios días, pueden ser esterilizadas. Se agrega unas 10 gotas de fenol al 5 % en el día en que se reciben, se tapa el envase y mezcla suavemente. Este desinfectante mata a todos los gérmenes del esputo, incluyendo a las micobacterias, pero aun así éstas se colorean por la técnica de Ziehl-Neelsen.

TRANSPORTE

Cuando el servicio de salud no cuenta con laboratorio, su personal debe conocer a qué laboratorio debe enviar las muestras, cuando y cómo. Tanto para baciloscopia como para cultivo es recomendable que el transporte

sea hecho, por lo menos, dos veces por semana. Se deben establecer los días de la semana en los que se efectuarán regularmente los envíos, el medio de transporte y el horario de salida y de llegada. Si los envíos no se hacen regularmente es conveniente que el laboratorio que va a recibir las muestras sea advertido previamente.

Se deben tener en cuenta las regulaciones vigentes en cada país para el transporte de muestras o su envío por vía postal. Mínimamente deben considerarse dos condiciones importantes:

- Protección del calor excesivo y de la luz solar
- Eliminación del riesgo de derrame.

Se puede utilizar para el transporte una caja de metal o una de plástico opaco, con algún mecanismo que trabase su tapa, y con una manija para facilitar su acarreo, como las que son utilizadas para trasladar material refrigerado o herramientas. También son útiles las cajas de plástico con tapa de cierre hermético, del tipo de las que se utilizan en el hogar para conservar alimentos u otros enseres, de altura ligeramente superior a la de los envases de las muestras. Estas cajas son fácilmente decontaminables por lavado con solución de hipoclorito de sodio. En el interior de las cajas se adapta una plancha en la que se cortan círculos de diámetro adecuado como para que encajen en ellos los envases de las muestras dentro de sus bolsas. Luego se rellena los espacios entre los envases con papel absorbente. Puede utilizarse papel destinado a ser descartado.

Cada envío debe ser acompañado por las hojas de solicitud de examen correspondiente o al menos por una lista con los datos de los pacientes: nombre y apellido, servicio, aclaración sobre si es muestra para diagnóstico (1ª, 2ª o 3ª) o para control de tratamiento indicando el mes. Los formularios deben ser enviados en un sobre, fuera de la caja que contiene los envases de las muestras.

Se debe verificar que la dirección del laboratorio al cual se envía la caja sea la correcta, que el número de envases corresponda con el del listado, que la identifi-

cación de cada envase coincida con la del listado y que en el listado conste claramente la fecha de despacho y el nombre del centro de salud que lo envía.

RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO QUE HACE LA BACILOSCOPIA

El personal del laboratorio que recibe las muestras debe:

- Colocarse guantes desechables, si están disponibles, o de uso doméstico.
- Abrir la caja sobre la mesada dedicada exclusivamente para este fin
- Inspeccionar las muestras controlando si se han producido derrames.
- Desinfectar el exterior de los envases con algodón con soluciones de fenol al 5% o hipoclorito de sodio al 1% si se han producido pequeños derrames durante el transporte. Si el derrame ha sido masivo esterilizar toda la caja en autoclave o incinerarla.
- Comprobar que las muestras estén bien identificadas.
- Desinfectar la caja con hipoclorito de sodio al 1%.
- Descartar los guantes desechables o sumergir las manos enguantadas con guantes domésticos que van a ser reutilizados en una solución de hipoclorito de sodio al 1%.
- Lavarse las manos luego de quitarse los guantes.
- Anotar en el Registro de laboratorio los datos de cada paciente, el tipo y calidad de la muestra recibida, el objetivo del estudio (diagnóstico o control de tratamiento).
- Anotar los datos de cada paciente, el tipo y calidad de la muestra recibida, el objetivo del estudio (diagnóstico o control de tratamiento)
- Notificar al servicio que derivó las muestras, si se han observado inconvenientes especialmente en la



calidad y cantidad de los esputos y en la forma de envío.

Si el laboratorio que recibe las muestras no realiza cultivo, deberá tener establecida la conexión con un laboratorio de referencia que si lo realice, y organizado el transporte regular, idealmente al menos dos veces por semana. Se deben establecer los días de la semana en los que se efectuarán regularmente los envíos, el medio de transporte y el horario de salida y de llegada. Si los envíos no se hacen regularmente, es conveniente que el laboratorio que va a recibir las muestras sea advertido previamente

ENCAUZAR PARA CULTIVO

Las muestras recibidas para diagnostico

- **extrapulmonares**
- **de niños**
- **de inmunosuprimidos, particularmente HIV positivos**
- **de lavado gástrico, lavado bronquial o hisopados**
- **de pacientes com antecedentes de tratamiento antituberculoso, especialmente si se registró abandono o fracaso**
- **de pacientes con exposición a infección por bacilos resistentes a las drogas (contactos de casos con tuberculosis resistente, internados o trabajadores de instituciones de salud o de prisiones donde se registran casos con tuberculosis multirresistente)**

Las muestras recibidas para control de tratamiento de casos

- **con baciloscopia positiva en el control del segundo mes de quimioterapia o en un control posterior**
- **casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento**

Como fue dicho, es conveniente que la baciloscopia de las muestras extrapulmonares, y de lavados gástrico y bronquiales, sea realizada en el laboratorio que va a realizar el cultivo.

La unidad de salud recibirá instrucciones especiales para derivar para cultivo las muestras necesarias en el caso en que se este realizando un estudio para vigilar la resistencia a drogas antituberculosas

La **ácido-alcohol resistencia** es la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared fucsina fenicada (de color fucsia) o auramina (amarillo fluorescente) y retenerla aun con la acción de decolorantes , como la mezcla de ácido y alcohol. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen en la pared celular. Así, utilizando una técnica adecuada es posible identificar al bacilo de la tuberculosis en la muestra del enfermo como un bastoncito rojo fucsia o fluorescente sobre una coloración de fondo que facilita su visualización

Esta propiedad no es específica del bacilo de la tuberculosis, sino que la tienen todos los bacilos del género *Mycobacterium*, aun las micobacterias ambientales y otros pocos microorganismos.

De todas formas, en los países de alta endemia de tuberculosis, una baciloscopia positiva en una muestra respiratoria de un paciente inmunocompetente tiene muy alto valor predictivo para el diagnóstico de tuberculosis. Es decir, es muy bajo el riesgo de equivocarse al diagnosticar tuberculosis por baciloscopia.

La coloración de Ziehl-Neelsen es la técnica más apropiada para ser utilizada en todos los laboratorios de los países de América Latina. Es la recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) por ser la que asegura resultados reproducibles con un entrenamiento sencillo y la más económica

En ciertos laboratorios y en escenarios particulares puede ser conveniente la utilización de la técnica de fluorescencia que agiliza el trabajo. Es aconsejable cuando el número de muestras diarias que deben ser examinadas es superior a 50. Para poder realizarla con calidad aceptable se debe contar con un microscopio de fluorescencia en buen estado y personal muy entrenado en la lectura de extendidos teñidos con auramina.

LUGAR DE TRABAJO Y MATERIALES

La baciloscopia puede ser realizada en laboratorios de cualquier complejidad, que posean un microscopio con lente de inmersión en buenas condiciones, algunos insumos de bajo costo e instalaciones simples en el laboratorio. . Deben seguirse normas básicas sencillas que aseguren calidad y minimicen los riesgos.

Es recomendable que el área de trabajo sea exclusiva, pero no siempre es posible. Si se debe

compartir un área del laboratorio, es necesario escoger un sitio preferentemente alejado de la entrada, para evitar corrientes de aire y movimiento de personal alrededor durante el procesamiento de las muestras. También es muy recomendable realizar los extendidos y coloraciones en un horario especial, en el momento de menor trabajo en el laboratorio.

Los requisitos mínimos del laboratorio son:

- Buena iluminación
- Ventanas o extractor para renovar el aire una vez finalizado el trabajo.
- Paredes y pisos lavables, que puedan ser desinfectados con solución de hipoclorito de sodio
- Una mesa o mesada para colocar las muestras que se reciban y realizar los extendidos, con dimensiones mínimas de 1 x 0,50 m, en lo posible cubierta con material liso y resistente a soluciones germicidas (fórmica, acero inoxidable o materiales similares). En caso de no contar con este tipo de mesada se puede utilizar bandejas o cubrir la mesa con un vidrio o papel.
- Un lavabo con fuente de agua y desagüe, en el que se pueda lavar las manos y realizar la tinción.
- Una repisa o armario para los reactivos, portaobjetos y demás materiales.
- Una mesa para el microscopio.
- Una mesa para escribir los informes y los registros del laboratorio



- Un armario para almacenar los frotis.

El equipo mínimo necesario para realizar las baciloscopias está integrado por los siguientes elementos:

- Dos batas o guardapolvos de uso exclusivo para cada persona que realice baciloscopia.
- Microscopio con objetivo de inmersión en buenas condiciones, con una lámpara de repuesto. En el caso de realizarse la técnica de fluorescencia es necesario, además, un microscopio de fluorescencia con oculares de 40 x.
- Envases para recolección de muestras.
- Aplicadores de madera o caña/bambú.
- Láminas portaobjetos nuevas, limpiadas con alcohol y secadas al aire.
- Frascos color ámbar para soluciones colorantes.
- Un soporte para sostener 12 láminas portaobjetos durante la preparación de extendidos.
- Varillas de vidrio u otro soporte inoxidable, de dimensiones adecuadas para sostener 12 láminas portaobjetos durante la tinción
- Un mechero, preferentemente de gas aunque puede utilizarse uno de alcohol
- Lápiz marcador de vidrio: graso o de tinta indeleble (que no sea de color rojo para evitar errores), con punta de diamante, de los que se utilizan para marcar cerámicas
- Papel de filtro.
- Papel para limpieza de lentes, pueden ser pañuelos de papel desechables.
- Una pinza.
- Un hisopo.
- Un recipiente para descartar los envases con muestras, con tapa, de material resistente al autoclavado e inoxidable o que contenga una bolsa roja para residuos patológicos.
- Aceite de inmersión: se recomienda no utilizar aceite de cedro, sino aceites a base de hidrocarburos sintéticos o de polímeros con índice de refracción de 1,5 debido a que no se secan, no se endurecen y no son disolventes de la fucsina
- Etanol al 70% o xilol

- Soluciones antisépticas:
fenol al 5%
hipoclorito de sodio al 1%.

Si el laboratorio recibe del Laboratorio de Referencia colorantes y reactivos fraccionados, listos para usar, no precisa equipamiento adicional.

Si recibe reactivos y colorantes en cantidades necesarias para preparar un volumen determinado (un litro, 100 ml, etc.), requiere recipientes de vidrio aforados para hacer la preparación.

Si, en cambio, debe preparar colorantes y reactivos requiere

- Una balanza.
- Recipientes de vidrio aforados para preparar las soluciones.
- Un embudo.
- Colorantes y reactivos químicos con muy buena calidad, para análisis (Ver Anexo II)

PREPARACION Y FIJACION DEL EXTENDIDO

Si se observan las medidas de bioseguridad recomendadas en el Anexo I, el riesgo del personal de laboratorio de adquirir la tuberculosis es mucho menor que el de quienes están cerca un enfermo que tose. La mejor medida para evitar riesgos y errores, que pueden originar resultados imprecisos o falsos, es la sistematización de las actividades siguiendo las siguientes indicaciones:

- Lavarse las manos
- Colocarse la bata o guardapolvo y guantes
- Ubicar en la mesada de superficie lisa, bandeja o papel embebido en hipoclorito de sodio al 1% sólo lo necesario para realizar el extendido:
 - mechero
 - aplicadores
 - soporte para los extendidos
 - lápiz para marcar láminas portaobjetos
 - láminas portaobjetos nuevos, previamente sumergidos en alcohol y secados al aire.
- no más de 12 envases con las muestras.
- Ubicar al lado de la mesa el recipiente para descartar el material con tapa
- Ordenar las muestras según su número.
- Para cada muestra, numerar una lámina portaobjetos, siempre en el mismo borde. Debe ser el mismo número asignado en el Registro del laboratorio, en el formulario de la orden de examen y en las paredes del envase que contiene la muestra. Si se utiliza lápiz graso, escribir el número en la cara inferior del portaobjetos para evitar que se borre durante la tinción. No tocar con los dedos la parte del portaobjetos destinada al extendido.
- Disponer las muestras a la izquierda del operador, o a la derecha, siempre en la misma posición, en orden creciente de numeración. Ubicar cada lámina marcada delante de la muestra que le corresponde.
- Usar una lámina para cada muestra. No colocar extendidos de más de una muestra en una lámina.
- Si las muestras estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases durante 20 minutos antes de comenzar a abrirlos.
- Tomar la primera muestra y la lámina correspondiente y colocarlas detrás del mechero de manera que la llama quede entre el operador y el frasco. Esta posición protegerá al laboratorista de posibles formaciones de aerosoles al abrir el frasco.
- Destapar con cuidado el envase.
- Partir un aplicador en dos, tratando de que las puntas queden ásperas.
- Tomar una parte del aplicador con la mano izquierda y la otra con la derecha, entre el pulgar y el índice, y con los extremos irregulares seleccionar la partícula más densa o purulenta de la muestra de esputo. Enrollarla en una de las partes del aplicador con la ayuda de la otra. Si la muestra contiene varias porciones mucopurulentas, tratar de mezclarlas con movimientos muy suaves del palillo y luego tomar una porción de la mezcla. Si sólo hay pequeñas partículas purulentas, escoger tres o más y mezclarlas en el mismo portaobjetos para homogeneizarlas.

La selección de la partícula más purulenta de la muestra es uno de los pasos más importantes para aumentar la probabilidad de identificar los casos de tuberculosis mediante la baciloscopia directa de esputo.

- Colocar la(s) partícula(s) seleccionada(s) sobre el portaobjetos y extenderla(s) con el aplicador con movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un círculo u óvalo de 2 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.
- Verificar que el extendido tenga grosor homogéneo y adecuado. Si es demasiado fino, es posible producir un resultado falso negativo. Si es muy grueso, el material puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos debajo de una capa gruesa de mucus. Se puede adquirir entrenamiento poniendo un papel impreso debajo del extendido. El grosor adecuado es el que permite ver pero no leer un texto impreso a través del preparado. Una vez adquirido el entrenamiento, es preferible no repetir rutinariamente este proceso para evitar tocar y transferir muestras con los papeles impresos.
- Dejar el extendido en un soporte ubicado al costado de la mesada para que se seque a temperatura ambiente. El extendido no debe ser calentado a la llama mientras esté húmedo pues el calor fuerte altera la estructura de los bacilos y su posterior tinción; además puede generar aerosoles.
- Desechar el aplicador en un frasco que contenga una solución de hipoclorito de sodio al 1%; este frasco irá al autoclave o directamente a incineración.
- Cerrar el envase de la muestra con la que se realizó el extendido y dejarlo en el lado opuesto al lugar donde están los frascos con las muestras que aún no se han procesado, para evitar confusiones.
- Continuar de la misma manera con cada una de las muestras siguientes.

- Conservar las muestras hasta terminar las lecturas de la baciloscopia y verificar que no es necesario realizar nuevos extendidos o enviarlas para cultivo.
- Limpiar la superficie de trabajo con una toalla de papel o algodón empapado en hipoclorito de sodio al 1% para desinfectarla.
- Descartar los guantes desechables, junto con las muestras en el recipiente destinado a este fin. Si se trata de guantes de uso doméstico, sumergir las manos enguantadas en solución de hipoclorito de sodio 1% antes de quitárselos
- Esperar a que las láminas se hayan secado al aire.
- Tomar de a uno cada extendido con una pinza manteniendo la cara que contiene la muestra hacia arriba, y pasarlos rápidamente sobre la llama de un mechero tres o cuatro veces cuidando que no se caliente demasiado.
- Colocar cada lámina fijada en un soporte, puede ser el soporte que se va a utilizar para la coloración.

Los extendidos deben ser coloreados de inmediato, ya que algunos bacilos pueden permanecer vivos después de fijados con calor hasta que incorporan la fucsina.

PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO	
	ORDENAR LAS MUESTRAS
	MARCAR LOS PORTAOBJETOS
	PARTIR EL APLICADOR
	SELECCIONAR LA PARTÍCULA MÁS PURULENTA
	DEPOSITAR EN EL PORTAOBJETOS
	EXTENDER LA MUESTRA UNIFORMEMENTE
	FIJAR EL EXTENDIDO CUANDO ESTÉ TOTALMENTE SECO

TINCION

La técnica de Ziehl Neelsen

Coloración

- Disponer dos varillas de vidrio en forma paralela, a una distancia de aproximadamente 5 cm entre una y otra una sobre un soporte dentro del lavabo/pileta de coloración;
- Filtrar la cantidad de fucsina necesaria para las tinciones a realizar en la jornada. Si el número de baciloscopias a colorear es pequeño, se puede filtrar la fucsina directamente cuando se la deposita sobre el extendido a través de un pequeño embudo con papel de filtro.



- Colocar sobre el soporte las láminas fijadas conservando el orden numérico con el extendido hacia arriba y manteniendo una separación de al menos 1 cm entre ellas.
- Cubrir totalmente la superficie del extendido con fucsina básica fenicada recién filtrada. Dispensar el colorante con suavidad, sin salpicar y sin tocar con el gotero o con el embudo los extendidos
- Con la llama de un hisopo embebido en alcohol calentar suavemente por debajo de los extendidos, con movimientos de vaivén, hasta que observe que se desprenden los primeros vapores blancos. No calentar con mechero.
- En caso de derrame del colorante, reponer la fucsina, no dejar secar el preparado.
- En el término de aproximadamente cinco minutos calentar tres veces hasta emisión de vapores; esto es suficiente para que la fucsina penetre adecuadamente en el bacilo y se fije a sus lípidos. **No hervir la fucsina porque la pared de los bacilos puede destruirse y colorearse mal.**

- Con una pinza, levantar cuidadosamente la lámina portaobjetos desde el extremo más cercano al operador. Enjuagar con abundante agua a baja presión, con un frasco o un grifo. Lavar muy suave y cuidadosamente la superficie eliminando totalmente la solución de fucsina. Girar el extendido y lavar con cuidado también la parte posterior.
- Inclinar el portaobjetos para eliminar el exceso de agua y así evitar diluir los reactivos que se utilizarán a continuación.

Decoloración

- Cubrir la totalidad del extendido con solución decolorante y dejar actuar aproximadamente 3 minutos
- Enjuagar con abundante agua a baja presión.
- Verificar que el extendido se ha decolorado (las partes más gruesas del extendido a lo sumo conservan un leve tinte rosado). Si se observan cúmulos rojos o coloración rosada intensa, volver a cubrir con solución decolorante, dejarla actuar entre uno y tres minutos y enjuagar nuevamente.
- Eliminar el exceso de agua inclinando el portaobjetos

Coloración de fondo

- Cubrir todo el extendido con solución de azul de metileno.
- Dejar actuar durante un minuto.
- Enjuagar las láminas en ambas caras con agua a baja presión y limpiar la parte inferior con un algodón si ha quedado coloreada.
- Observar si las láminas conservan la numeración clara y visible. Si no es así volver a numerarlas.
- Dejar secar las láminas a temperatura ambiente, apoyándolas en posición vertical en un soporte sobre un papel absorbente. No apoyar papel absorbente sobre el extendido.

TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN



CUBRIR CON FUCSINA FILTRADA



CALENTAR HASTA EMISIÓN DE VAPORES TRES VECES DURANTE 5 MINUTOS



LAVAR CON AGUA



CUBRIR CON DECOLORANTE DURANTE 3 MINUTOS



LAVAR CON AGUA



CUBRIR CON AZUL DE METILENO DURANTE 1 MINUTO



LAVAR CON AGUA



SECAR AL AIRE

Tinción fluorescente

Cuando se realiza tinción de los extendidos con los fluorocromos auramina-O ó auramina- rodamina, los BAAR se ven como bastoncillos amarillos fluorescentes. Para observarlos se utilizan microscopios de fluorescencia con luz halógena y un sistema especial de filtros.

Los extendidos son examinados con un objetivo de poco aumento, 40x, lo que permite observar una superficie mucho mayor del frotis en menor tiempo. Uno de los inconvenientes de esta técnica es que se produce mayor cantidad de artefactos. Por consiguiente se **debe confirmar las baciloscopias positivas** recolorando el mismo frotis teñido con fluorocromo por la técnica de Ziehl Neelsen. En cambio, los frotis coloreados mediante la técnica de Ziehl Neelsen no pueden ser reteñidos con fluorocromos.

Para la coloración hay que seguir los siguientes pasos:

- Preparar extendidos más finos que para la tinción por Ziehl Neelsen.
- Colocar los extendidos numerados en una gradilla de tinción en lotes de no más de 12, de la misma forma que para la coloración de Ziehl Neelsen.
- Cubrir los extendidos con solución de auramina-O y dejar actuar el colorante durante 15 minutos, asegurándose que el colorante permanezca sobre el frotis. No calentar.
- Enjuagar con agua destilada y dejar escurrir. No usar agua de grifo porque normalmente contiene cloro que puede interferir en la fluorescencia.
- Decolorar con alcohol-ácido durante 2 minutos en la forma mas completa posible.
- Enjuagar con agua destilada y dejar escurrir.
- Cubrir los extendidos con la solución de permanganato de potasio o con solución de naranja de acridina y dejar actuar durante 2 minutos. Si se deja mayor tiempo puede quedar enmascarada la fluorescencia de los BAAR.
- Enjuagar con agua destilada y dejar escurrir.
- Dejar secar los frotis al aire y al abrigo de la luz. No secar con papel de filtro.

- Examinar al microscopio lo más pronto posible después de la tinción porque pueden perder la fluorescencia.

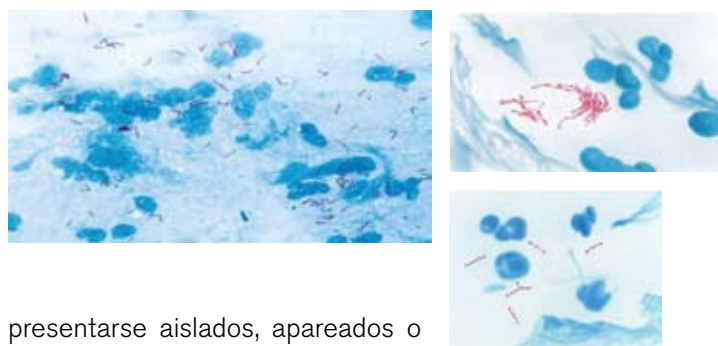
OBSERVACION MICROSCÓPICA Y LECTURA DE EXTENDIDOS

La observación microscópica debe cumplir principalmente dos objetivos:

- determinar si en el extendido hay BAAR
- si los hay, cuantificar aproximadamente la riqueza en bacilos.

Características morfológicas del bacilo de la tuberculosis

Los bacilos acidorresistentes tienen entre 1 y 10 µm de largo. Con la coloración de Ziehl Neelsen se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, rojo fucsia, destacándose claramente contra el fondo azul. En los extendidos teñidos con auramina los bastoncitos se observan con fluorescencia amarilla. A veces se observan con gránulos o cuentas intensamente coloreados en el interior. En la muestras de esputo pueden



presentarse aislados, apareados o agrupados. Es muy difícil distinguir el bacilo de la tuberculosis de otras micobacterias por examen microscópico. Algunas micobacterias que no son *M. tuberculosis* pueden aparecer como bastones muy largos o como bacilococos.

Otros microorganismos pueden presentar distintos grados de ácidorresistencia, como *Rhodococcus*

spp., *Nocardia spp.*, *Legionella spp.* y los quistes de *Críptosporidio* e *Isospora spp.* Se observan como cocos, bacterias con formas variadas (pleomórficas), filamentos que a veces están cortados, o como esferas de gran tamaño si se las compara con las bacterias.

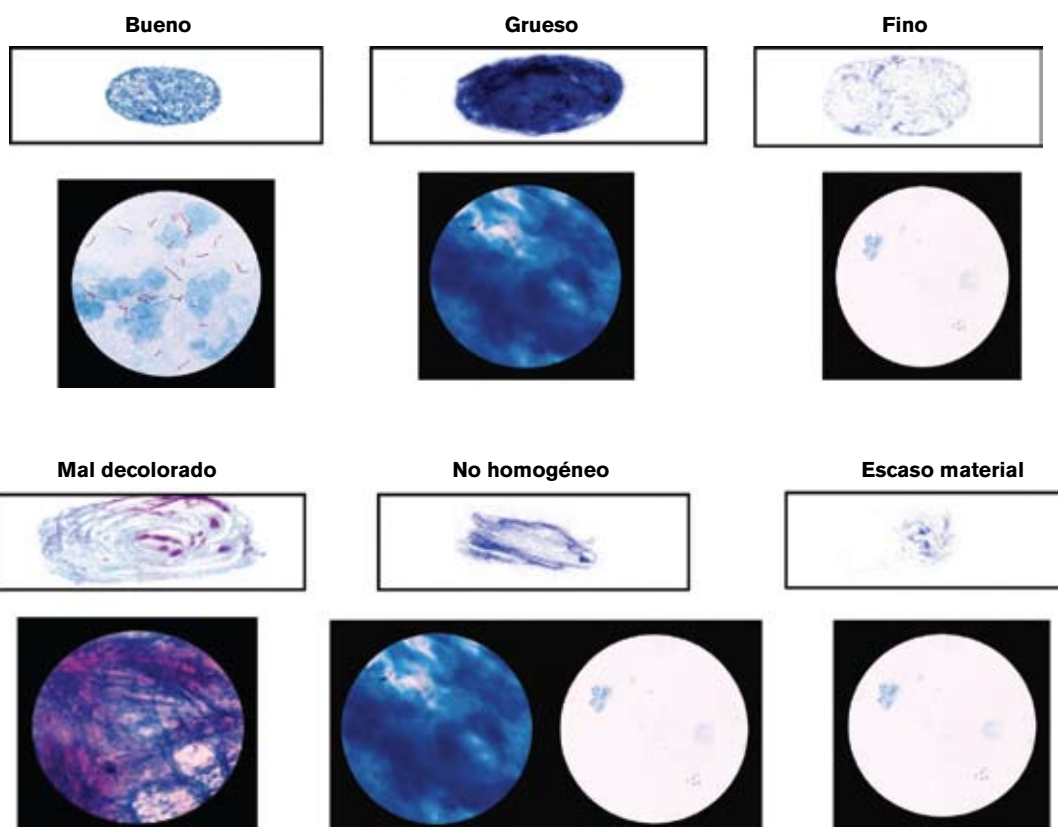
De todas formas, es poco frecuente encontrar más de 10 microorganismos ácido alcohol resistentes diferentes a *M. tuberculosis* en las muestras de esputo de los SR. Cuando el baciloscopista observa alguno que no tiene forma de bastón debe consultar al supervisor.

Lectura de extendidos coloreados por Ziehl Neelsen

- Ubicar cerca del microscopio todos los elementos necesarios:
 - aceite de inmersión
 - pañuelos o trozos de papel suave
 - el Registro del Laboratorio
 - una lapicera
 - una caja para guardar portaobjetos

- un frasco con xilol o con etanol a 70%.

- Depositar una gota de aceite de inmersión en un extremo del frotis, sin tocar el preparado con el gotero.
- Enfocar el extendido donde ha colocado la gota de aceite, con la lente 100x de inmersión (ver Anexo III)
- Observar cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el tornillo micrométrico, antes de desplazarse al campo contiguo.
- Seguir un recorrido en líneas rectas, sistemático para recorrer el extendido evitando repetir la lectura de algunos campos. Ej: de izquierda a derecha:
- Observar la calidad del extendido y de la coloración. Si no fuesen buenas, repetir nuevamente la baciloscopia de esa muestra.



- Si se observan anomalías, identificar las causas
 - Si observa BAAR que se mueven en forma anormal, pueden ser bacilos provenientes de otra baciloscopia que fueron arrastrados por el aceite de inmersión y es necesario reemplazarlo y repetir la baciloscopia.
 - Si se observan cuerpos extraños (artefactos) que se mueven cuando se desplaza el portaobjetos, pueden ser restos de alimentos, precipitados o cristales. Si sólo se mueven cuando se gira el ocular, se trata de suciedad que está en el ocular y hay que proceder a limpiarlo.
 - Si no se mueven, la suciedad o bacilos contaminantes puede estar en los objetivos, el condensador, el espejo o la fuente de iluminación; proceder a limpiarlos.
- Contar el número de campos que ha leído y el número de BAAR que ha identificado. Se puede utilizar una cuadrícula de 10 cuadrados por 10 cuadrados, que representan los 100 campos microscópicos, como ayuda para registrar la cuenta. En cada cuadrado anotar el número de BAAR que se observa. Si no observa BAAR consignar 0.

0	0	1	0	4	0	0	0	2	5
7	3								

El numero total de campos a examinar depende de si se encuentran bacilos y en que concentración

Promedio de BAAR encontrados	Número mínimo de campos útiles a examinar
Ninguno	100
Menos de 1 por campo	100
1 a 10 por campo	50
Más de 10 por campo	20
De 1 a 9 en todo el extendido	100

- Para calcular el promedio de BAAR encontrados por campo, sumar el total de BAAR contados y dividir ese total por el número de campos observados. Cuando los bacilos se presentan agrupados, una estimación aproximada del número de bacilos presentes en el cúmulo es suficiente para calcular este promedio.
- Los campos leídos deben ser "campos microscópicos útiles". Se considera campo microscópico útil a aquel en el cual se observan células bronquiales (leucocitos, células ciliadas) o fibras mucosas, que aparecen teñidos de azul. Los campos sin estos elementos no deben ser considerados para contar el total de campos observados, a menos que contengan BAAR.
- El extendido preparado tal como fue descrito permite observar 100 campos microscópicos en línea recta. Puede ser necesario leer una segunda línea para encontrar los 100 campos útiles.
- Un microscopista experimentado completa la lectura de 100 campos en aproximadamente cinco minutos.
- Al finalizar la lectura, girar el revolver de los objetivos y retirar el portaobjetos de la platina
- Comprobar el número de identificación y registrar el resultado.
- Antes de examinar el portaobjetos siguiente, limpiar suavemente la lente de inmersión con un trozo de pañuelo de papel absorbente. Esto evita la transferencia de material al siguiente frotis que se va a leer.



Lectura de frotis coloreados con fluorocromos

Cuando se leen extendidos coloreados por métodos fluorescentes se deben tener en cuenta las siguientes particularidades

- Examinar los extendidos coloreados con fluorocromos lo más pronto posible después de la tinción porque la fluorescencia se desvanece rápidamente; si no es posible leerlos inmediatamente deben guardarse en un lugar oscuro, de preferencia en el refrigerador, durante un lapso máximo de 24 hs.
- Enfocar con el objetivo de 40 aumentos.
- Leer el mismo número de campos y promediar el número de bacilos encontrados según lo indicado para la lectura de extendidos coloreados por Ziehl Neelsen.
- En el caso de tener resultados positivos, dividir por 4 el promedio de bacilos calculado.
- Seleccionar los extendidos positivos y colorearlos nuevamente mediante la técnica de Ziehl Neelsen.
- Confirmar la positividad observando con microscopio convencional, con aumento 100 x y siguiendo el método de lectura de Ziehl Neelsen. Si es necesario, leer más de 100 campos con el microscopio óptico. Hay que considerar que la superficie observada con la lente 40 x es 4 veces mayor a la superficie observada al leer con 100 x.



Procedimientos a seguir frente al hallazgo de menos de 5 BAAR en 100 campos observados

Debido a la posibilidad de que se trate de artefactos de coloración, se recomienda:

- Ampliar la lectura a 200 campos.
- Si con esa lectura no se encuentran más bacilos, hacer otro extendido de la misma muestra, tratando de elegir partículas purulentas.
- Si la lectura del segundo extendido no modifica el

resultado del anterior la muestra debe informarse con el número exacto de bacilos observados, consignando en el Libro de Registro el hallazgo y solicitar una nueva muestra.

- Cultivar o enviar para cultivo estas muestras

INFORME DE LOS RESULTADOS

La siguiente es la escala adoptada internacionalmente para el informe de los resultados de extendidos examinados por la técnica de Ziehl Neelsen:

Resultado del examen microscópico	Informe
No se encuentran BAAR en los 100 campos observados	No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes
Se observan de 1 a 9 BAAR en 100 campos observados	Nº exacto de bacilos en 100 campos
Se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados	Positivo (+)
Se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados	Positivo (++)
Se observan más de 10 BAAR por campo en 20 campos observados	Positivo (+++)

El informe utilizando la escala semi-cuantitativa estandarizada asegura la reproducibilidad de los resultados y permite evaluar

- la gravedad de la enfermedad
- la infectividad del paciente
- la evolución del paciente bajo tratamiento

- Registrar inmediatamente el resultado de la lectura en el Registro del Laboratorio. Marcar los resultados positivos en rojo, para identificarlos rápidamente.
- Escribir el resultado en el formulario adoptado para el informe por el PNCT

- Verificar que el informe contenga
 - El nombre del paciente
 - El número de identificación de la muestra
 - El método de tinción utilizado
 - El resultado del examen microscópico expresado según la escala estandarizada
 - La fecha
 - Toda observación que considere relevante, por ejemplo la calidad de la muestra si es inadecuada
 - Firma del responsable del examen microscópico
- Enviar el resultado lo más pronto posible al centro de salud o al médico que solicitó el examen. El tiempo que tarda en enviar los resultados es indicador de la eficiencia de su laboratorio.

Toda demora en la entrega de un resultado positivo puede retrasar el inicio del tratamiento, prolongar el período durante el cual el paciente permanece infeccioso o determinar que se pierda un enfermo.

Es necesario el mayor esfuerzo posible para que los resultados de la baciloscopia sean recibidos por la unidad de salud dentro de 24 horas de entregada la muestra al laboratorio.

DECONTAMINACION Y DESECHO DEL MATERIAL

- Desechar las muestras colocándolas en el recipiente de descarte, junto con los aplicadores y los papeles que eventualmente se hubieran utilizado en todas las etapas, y los guantes desechables.
- Autoclavar este recipiente al final de cada jornada.
- Si es imposible autoclavar agregar 10 gotas de fenol al 5% al remanente de las muestras no utilizado, dejar los envases tapados hasta el día siguiente, y despacharlos luego con los desechos patógenos habituales del laboratorio para que sean esterili-

zados por el servicio que se encarga de esta tarea.

- Si ninguno de estos procedimientos de esterilización está disponible, incinerar el material potencialmente infeccioso. En este caso, descartar el material dentro de una bolsa plástica impermeable ubicada dentro del recipiente de descarte. Al finalizar las tareas, cerrar la bolsa anudándola, tapar el recipiente y transportar el material dentro del recipiente hasta el lugar donde será incinerado. Puede ser un incinerador, una fosa al aire libre o un recipiente del tipo de los de gasolina vacío. Allí se deposita la bolsa. El operador debe alejarse cuando se encienda el fuego porque el humo producido por los envase plásticos es tóxico y los aerosoles que se generan peligrosos. Decontaminar el recipiente en el que se transportó el material con fenol al 5% por fuera y por dentro utilizando guantes.

DERIVACIÓN DE MUESTRAS PARA CULTIVO

El cultivo incrementa la posibilidad de detectar el bacilo de la tuberculosis en las muestras de casos que están afectados por un bajo número de bacilos, como los niños (tuberculosis primaria) o pacientes con tuberculosis extrapulmonar. Además, permite diferenciar el bacilo de la tuberculosis de otras micobacterias en muestras donde se pueden encontrar ambos, como en orina, contenido gástrico, o las de pacientes que viven con VIH. Por último, permite conocer la sensibilidad de bacilos a drogas antituberculosas e identificar los casos que pueden no responder al esquema de tratamiento de primer línea. Esto puede ocurrir entre pacientes tratados en forma irregular o con dosis insuficientes, y entre sus contactos.

El laboratorio debe encauzar la investigación por cultivo en los siguientes casos aun cuando no exista solicitud de cultivo por parte del médico.

Muestra	Examinada para	y tomada de un paciente	Encaminar la muestra para
Espuito	diagnostico	con síntomas respiratorios persistentes y dos o mas muestras anteriores con baciloscopias negativa	cultivo
Cualquiera Baciloscopia negativa o positiva	diagnóstico	inmunodeprimido	Cultivo e identificación
Cualquiera Baciloscopia negativa	diagnóstico	niño	
Lavado bronquial Contenido gástrico Baciloscopia negativa o positiva	diagnóstico	cualquiera	
Cualquiera Baciloscopia positiva	diagnóstico	• con antecedentes de tratamiento • contacto de paciente multirresistente • expuesto a infección hospitalaria o en cárceles donde se asisten/ internan casos resistentes a las drogas	prueba de sensibilidad directa a partir de la muestra (si el resultado de la baciloscopia es 2+ o 3+)
Espuito Baciloscopia positiva	control de tratamiento	• que finalizó dos o mas meses de tratamiento • que convirtió su baciloscopia de negativa a positiva	o cultivo y prueba de sensibilidad

Para producir resultados precisos, oportunos y evitar la formación de aerosoles y transferencia de material entre muestras distintas verifique si ha incorporado los siguientes hábitos en la rutina:

- controlar la exactitud y claridad de la identificación de cada muestra en el envase, lámina, registro e informe de resultado
- no trabajar con más de 12 muestras en cada serie
- mantener el orden de laminas y envases, según su numeración, de izquierda a derecha
- procesar las muestras de a una, no abrir el siguiente envase antes de cerrar el anterior
- maniobrar con suavidad el envase con la muestra
- no introducir en el envase aplicadores, asas sin esterilizar o utensilios utilizados con otra muestra
- utilizar láminas nuevas, sin marcas y desengrasadas
- seleccionar la partícula mucopurulenta
- extender homogéneamente suficiente cantidad de la partícula útil, sin exceso, en un pequeño óvalo centrado en el portaobjetos
- mantener los extendidos separados unos de otros en todo momento
- no tocar los frotis con las manos, goteros, varillas o grifos
- evitar salpicaduras con las soluciones o el agua
- filtrar la fucsina fenicada en el momento de uso, dejarla actuar 5 minutos calentando 3 veces hasta desprender vapores, sin hervir
- eliminar el agua remanente de lavados
- descartar y volver a preparar frotis que por accidente se hayan superpuesto o resulten mal coloreados
- limpiar la lente del microscopio luego de leer cada lámina
- dedicar no menos de 5 minutos a la lectura de cada preparado
- cuantificar bacilos en el extendido utilizando la escala estandarizada
- evitar toda demora que pueda ser eliminada
- encaminar para cultivo las muestras de los casos que lo requieren

El registro del laboratorio no sólo sirve para documentar los resultados del examen microscópico de las muestras. También aporta información que, integrada a la producida por otros laboratorios, es útil para evaluar la situación epidemiológica y la calidad de las actividades destinadas al control de la tuberculosis y para planificar futuras actividades. Además permite conocer y seguir el desarrollo, utilización y eficiencia de los servicios de la Red de Laboratorios

El laboratorio debe poder rastrear en sus registros las muestras recibidas, procesadas y derivadas para cultivo y prueba de sensibilidad, SR investigados, casos diagnosticados y controlados, el resultado de las baciloscopias de cada paciente, reactivos e insumos recibidos y consumidos, lotes de colorantes, decolorantes, soluciones antisépticas preparadas y consumidas, resultados de controles de calidad interno.

Los laboratorios de la Red deben contar con los siguientes instrumentos estandarizados por el PNCT Formulario de Solicitud de Baciloscopia/Informe de Resultados y Registro de Muestras para Investigación Bacteriológica de la Tuberculosis. En el Anexo IV se presentan modelos de estos instrumentos, de los registros de preparación/control de calidad de colorantes y de controles de calidad.

Los registros deben ser conservados durante el tiempo que indique la legislación de cada país y si no está normado, al menos durante 2 años.

- **La precisión en la documentación es crítica para rastrear resultados, evaluar y planificar apropiadamente las actividades**
- **Los instrumentos de registro deben seguir las normas del Programa de Control de Tuberculosis**
- **Los registros deben estar completos y contener información confiable y consistente**

CONTROL DE CALIDAD DE LAS BACILOSCOPIAS

El control de calidad permite evaluar si la información producida por el laboratorio es precisa, reproducible y oportuna.

**Instaura un sistema de alarmas que permite prevenir, descubrir y corregir errores
Resulta más eficaz para detectar y asistir a los casos de tuberculosis y para controlar la enfermedad**

El control de calidad es un procedimiento que emprenden en conjunto los distintos niveles de la red de laboratorios y tiene como objetivo a elevar y mantener la calidad de trabajo. No tiene carácter punitivo (aplicación de sanciones).

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Es responsabilidad de cada laboratorio que realiza baciloscopias. En particular, el responsable del laboratorio debe establecer en la rutina de trabajo un sistema de controles regulares y continuos de los puntos críticos.

El control de calidad interno comprende

- la evaluación de materiales, equipos, reactivos
 - el desempeño del personal
 - los procedimientos
 - la precisión y oportunidad de los informes
 - la oferta y aplicación adecuada de la baciloscopia
 - el rendimiento de la baciloscopia para detectar casos
- el seguimiento de los resultados de los controles de calidad
- las medidas correctivas a aplicar cuando la imprecisión del resultado excede los límites considerados aceptables o se producen demoras evitables

Causas de error en la microscopía

		Falsos positivos	Falsos negativos
Inherentes a la muestra	- No representativa de la lesión - Recogida en momento inadecuado - Insuficiente - Mal conservada		X X X X
Inherentes al operador	- Mala selección de la partícula útil - Defectos en la realización del extendido: - extendidos finos, gruesos o poco homogéneos - fijación de extendidos húmedos o a temperaturas superiores a 60°C - Defectos en la realización de la coloración: - calentamiento deficiente o excesivo - decoloración insuficiente - precipitación de cristales por uso de reactivos no filtrados o calentamiento excesivo - decoloración excesiva - Defectos en la lectura: - uso de microscopio en mal estado - lectura de un número insuficiente de campos - observación de 1 solo nivel del extendido - poco entrenamiento para diferenciar bacilos de artificios de coloración. - Transferencia de bacilos de un extendido a otro por el asa mal flameada, salpicaduras o el dispensador de aceite de inmersión contaminado. - Confusión de muestras y/o extendidos - Errores en transcripción de resultados	 X X X X X X X X X	 X X X X X X X X
Inherentes a la técnica	- Límite de sensibilidad 5.000-10.000 bacilos/ml de muestra - se detectan BAAR que pueden ser no patógenos y nocardias. - hay 1 a 9 bac/100 campos	X	X X

Control de colorantes y microscopios:

- Tratar muestras positivas y negativas tratadas previamente con 10 gotas de fenol 5% durante por lo menos media hora. Preparar con ellas tantos extendidos como sean necesarios, para que puedan ser utilizados durante dos meses Si no se reciben suficientes muestras positivas, solicitar los extendidos al laboratorio de referencia. Guardarlos en
- Controlar la calidad de cada nuevo lote de colorantes tiñendo una lámina negativa y otra positiva. Registrar el resultado de este control en el libro de preparación/control de reactivos.
- Comprobar que los BAAR se vean completa e

intensamente coloreados con fucsina o auramina y que la coloración de fondo sea uniforme, del color esperado y que ofrezca buen contraste.

Si en los extendidos positivos no se detectan BAAR o los BAAR están mal teñidos la fucsina o la auramina es defectuosa. Si observa una coloración de fondo violácea con la tinción de Ziehl Neelsen, el decolorante o el colorante de fondo pueden estar defectuosos.

Si se observan aparentes BAAR en el extendido negativo, puede ser que el decolorante esté defectuoso o que haya contaminantes ácido-alcohol resistentes en las soluciones de colorantes.

- Verificar si la cuantificación de bacilos coincide con la inicialmente asignada a la muestra con la que se prepararon los extendidos positivos. Registrar los resultados de estos controles de calidad
- Si se detectan defectos, repetir el control con otros extendidos para descartar un posible error en la técnica de tinción. Si persiste el defecto, descartar los reactivos defectuosos o contaminados.
- Si se realizan más de 10 baciloscopias por día, se debe repetir el control arriba descrito (coloración de un extendido positivo y uno negativo) una vez por semana.

Si se realizan menos de 10 baciloscopias por día se deben incluir los frotis positivo y negativo como control diariamente.

Control de registros e indicadores de la calidad de trabajo:

- Disponer que una persona no involucrada en la realización e informe de la baciloscopia verifique un día por semana al azar, que los datos y resultados consignados en los informes elaborados ese día coincidan exactamente con los registrados en el Registro del Laboratorio. Esto debe ser realizado por el responsable del laboratorio, en el caso en que él mismo no procese e informe muestras.
- Verificar que las muestras estén siendo procesadas en el día en que fueron recibidas o al día siguiente.

Si el laboratorio no puede hacer baciloscopias todos los días, o si recibe muestras de centros periféricos, verificar que no transcurran más de 3 días desde que las muestras fueron tomadas hasta que son procesadas e informadas.

- Controlar que los resultados de las baciloscopias se estén entregando regularmente 24 horas después de procesada la muestra.
- Verificar que los resultados sean recibidos, en el servicio en el que el paciente entregó su muestra o en el consultorio del médico que solicitó el estudio en el menor tiempo posible por más alejados que estén.
- Verificar que hayan sido derivadas para cultivo o cultivadas las muestras que requieren ser cultivadas según lo indicado.

Analizar mensualmente y mantener un registro de los siguientes indicadores:

- Número de SR examinados
- Número de baciloscopias realizadas
- Número de baciloscopias realizadas para diagnóstico/número de SR investigados
- Porcentaje de casos diagnosticados por baciloscopia entre los SR

Si estos valores se alejan significativamente de los habituales, se deben investigar las causas.

- Sucesión de resultados positivos en uno o unos pocos días de trabajo. Si se detectan, investigar si se ha producido contaminación cruzada (transferencia de bacilos desde una muestra altamente positiva a las siguientes)
- Porcentaje de pacientes con resultado positivo en la primera y segunda muestra de esputo, investigadas para diagnóstico. Deber ser al menos 95%.
- Proporción de muestras deficientes entre las de diagnóstico: no debe superar el 20%.
- Porcentaje de resultados de lecturas 1 a 9 BAAR en 100 campos. Debe ser menor a 10% de los positivos y corresponder fundamentalmente a baciloscopias realizadas para control de tratamiento.

En el caso en que detecten anomalías y no se puedan ser identificadas las causas, consultar al laboratorio de referencia.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

De láminas

Es responsabilidad del laboratorio de referencia. Todas las láminas deben ser conservadas durante al menos un mes, porque pueden ser solicitadas por el laboratorio de referencia para su relectura.

Conservación de las láminas:

- Quitar el aceite de las láminas leídas presionando muy suavemente sobre ellas un papel absorbente.
- Colocarlas en el soporte de coloraciones y cubrirlas o sumergirlas en un recipiente para lavado de láminas portaobjetos, con xilol o alcohol 70%, durante no más de 30 segundos.



- Volcar el alcohol o xilol y dejar secar al aire.
- Comprobar que la numeración esté visible en las láminas.
- Guardarlas en cajas para láminas portaobjetos, o dentro de una caja común envueltas individualmente en papel, en paquetes que agrupen las de un día o de una semana, rotulados con la fecha, en el orden en que se realizaron. No poner en este rotulo el resultado de cada una.
- Conservarlas en lugar seco y fresco.
- Descartarlas después de un mes si no han sido solicitadas por el laboratorio de referencia.

Eventualmente, se puede recibir del laboratorio de referencia un panel de láminas para colorear, leer e informar. Este panel debe ser introducido en el procedimiento de rutina, sin realizar procedimientos especiales para este control.

Mantener en un archivo los resultados de los controles de calidad externo. Analizar cada resultado e implementar medidas correctivas, si fueran necesarias, siguiendo las recomendaciones del laboratorio de referencia.

Normalmente son requeridos los registros y los resultados de control de calidad interno y externo durante la visita de supervisión. Deben estar disponibles.

Operacional

De acuerdo a las normas establecidas, se deben enviar al nivel de referencia de cada laboratorio, copias de los registros de resultados de la baciloscopia, o el consolidado de resultados mensual, trimestral o cuatrimestral. Una vez analizados, el laboratorio referente enviará las observaciones y las recomendaciones sugeridas las cuales deberán ser analizadas y puestas en práctica.

BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA

Acosta Reyes I, Reyes L, Rodríguez A. Marcelino B, Diclo J, Cabada RE, Heredia J, Tejada D. Red Nacional de Laboratorios del Programa Nacional de Control de Tuberculosis. Manual de Normas Para el Uso de la Bacteriología en Tuberculosis. República Dominicana. 2004.

Aziz MA, Ba F, Becx-Bleumink M, Bretzel G, Humes R, Iademarco MF, Sang Jae Kim, Lamothe F, Paramasivan CN, Ridderhof J, Sloutsky A, Van Deum A, Shah KV, Weyer K. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. WHO, APHL, CDC, IUATLD, KNCV, RIT. Washington DC, 2002.

Birkin N, Espinal M, Granch R, Jarvis W, Kumaresan J, Rieder H, Simone P. Normas para la prevención de la Tuberculosis en los establecimientos de asistencia sanitaria en condiciones de recursos limitados. WHO/CDS/TB/99269. 2002.

Blancarte L, de Kantor, I, Latini O, Laszlo A, Valenzuela P, Yáñez A. INPPAZ. Bacteriología de la tuberculosis. La muestra. El examen microscópico. Nota Técnica N°26 / Rev1. OPS/OMS. Martínez (Buenos Aires, Argentina), 1988.

Camacho Prado M, Limache Ormachea G, Valdez Taboada D. Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis de Bolivia. Manual de Laboratorio. La Paz, 2000.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology. Organization and Practice. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997.

De Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY, Rieder HL, Valenzuela P, Weyer K. Los servicios de laboratorio en el control de la tuberculosis. II Microscopía. WHO Global Programme. WHO/TB/98.258. Geneve, 1998.

De Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY, Rieder HL, Valenzuela P, Weyer K. Los servicios de laboratorio en el control de la tuberculosis. I Organización y Gestión. WHO Global Programme. WHO/TB/98.258. Geneve, 1998.

Del Grando M, Cruz R, Camacho M. Gil E. Programa Nacional de Control de Tuberculosis de Bolivia. Manual de Normas Técnicas. La Paz, 1999.

Flor Freire L, Kuffó Mendoza D, Vasconz Carrizares M, Cobo León J, Brito Páez G, Luna Echeverría G. Normas Técnicas del Programa Nacional de Control de Tuberculosis de Ecuador. Quito 2002.

Fujiki A. TB microscopy. Tokio, Japan: The research Institute of Tuberculosis, Japan Antituberculosis Association, Japan International Corporation Agency, Hachioji International Training Centre, 1998.

Garzón MC, Naranjo ON, Sierra CR, Llerena C, Orjuela DL. Instituto Nacional de Salud de Colombia. Bacteriología del Mycobacterium tuberculosis y de otras Micobacterias no Tuberculosas. Manual de Procedimientos. Bogotá. 2001.

International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide for sputum examination for tuberculosis by direct microscopy. Bull Int Union Tuberc 1978;4-16.

Jara Rodríguez JC, Salvadó Lahaye C, Adé y Torrent MP, Negrete Montiel D, Toledo Gehrmann I. Programa Nacional de Control de Tuberculosis de Paraguay. Manual de Diagnóstico Laboratorial del Mycobacterium tuberculosis. Asunción, 2003.

Kleeberg h, Koornhof H and Palmhert H. Tuberculosis research Institute of the South African Medical Research Council. Laboratory Manual of Tuberculosis Methods. Second edition. Pretoria 1980.

Laszlo A, Weyer K, Barrera L, Balandrano S, Ridderhof J, Jost K, Smithwick R, Shah K, Lennon G. Baciloscopia Directa de BAAR. programa para Capacitación de Laboratorios. 2000.

Laszlo A. et al. UICter. Guía Técnica para los países con escasos recursos económicos. Diagnóstico de la tuberculosis por examen microscópico directo de la expectoración. Quinta edición. París. 2000.

Latini O. Microscopía. Guía Técnica de la Red de Laboratorios de Tuberculosis de Argentina. Argentina, 2000.

Lima Campelo C, Duarte Vieira F, Ignez Salem J, Maia R, Vianna Jardim SB, Barroso WJ, Arantes Martetelo A. Tuberculose. Diagnóstico laboratorial Baciloscopia. Ministerio de Saúde de Brasil. Brasília 2001.

Luna Heinze A, Lepe Lepe R, Velasco Ramírez M, Arias Muñoz F, Ibarra Ibarra P. Evaluación de la Red de Laboratorios de Tuberculosis de Chile, Año 2002. Santiago 2004.

Manual de Procedimientos para el Diagnóstico de la Tuberculosis y otras Micobacterias. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri. Cuba. Procedimiento para el examen de esputo, cultivo e identificación de cepa. La Habana, 1997.

Menbreño HC, Almeaz NL, Newely Rodríguez Y. Laboratorio Central de Honduras. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos en el Diagnóstico de Tuberculosis por Baciloscopia. Tegucigalpa. 2002.

Mendía de Campollo E, Tromme M. Laboratorio Nacional de Salud de Guatemala. Laboratorio Central y de Referencia en Tuberculosis. Manual de Técnicas y Procedimiento de Bacteriología de la Tuberculosis. Guatemala, 2001.

MMWR Guidelines for Preventing the Transmission of Mycobacterium tuberculosis in Health-Care Settings, December 2003; 52 (RR17); 1-141.

Normas Técnicas del Programa Nacional de Control de Tuberculosis de Chile. El Laboratorio en el Programa Nacional de Control de Tuberculosis. Santiago, 2000.

Normas Técnicas del Programa Nacional de Control de Tuberculosis de Costa Rica. 2001

OMS. Manual de bioseguridad en laboratorios. 3ª edición. Ginebra. 2005.

Pío A, Chaulet P. Tuberculosis Handbook. WHO/TB/98253. Geneve 1998.

Prado Malespin MF. Manual del Programa Nacional de Control de Tuberculosis de Nicaragua. Managua, 2001

Programa Nacional para el Control de Tuberculosis de Panamá. Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Panamá, 2005.

Rieder HI, Chonde TM, Myking H, Urbancik R, Laszlo A, Kim SJ, Van Deun A, Trébucq A. The Public Health Service National Tuberculosis Reference Laboratory and the National Laboratory Network. Minimum Requirements, Role and Operation in a Low-Income Country. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. París, 1998.

Sequeira MD, Latini O, López B, Símboli N, Barrera L. Garantía de Calidad de los Métodos bacteriológicos aplicados al Diagnóstico y control del Tratamiento de Tuberculosis. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" INER E. Coni./ INEI.. DOC. TEC. INER. DyR . N° 10/03. Argentina 2003.

Smithwick RC. Laboratory Manual for Acid-fast Microscopy. 2nd.ed. US Department of Health, Education and Welfare, Centers for Disease Control, Bacteriological Division Mycobacterial Reference Section; Atlanta,Georgia, 1979.

Suárez A. PG. Actualización de la Doctrina, Normas y procedimientos para el Control de la Tuberculosis en Perú. Lima, 2000.

Tratamiento de la Tuberculosis. Directrices para los Programas Nacionales. WHO/TB/97220. Geneve, 1995.

Treatment of TB Guidelines for National Programs. WHO/CDS/TB 2003, Geneve, 2003.

WHO. Toman's Tuberculosis. Case detection, treatment and monitoring: questions and answers. T. Frieden, editor. 2ª edition. WHO, 2004.

ANEXO I

NORMAS MÍNIMAS DE BIOSEGURIDAD

La información disponible evidencia contundentemente que el personal de salud con mayor riesgo de infección por aspiración de núcleos de gotas conteniendo BAAR eliminados por pacientes bacilíferos al toser, es el más cercano a los pacientes (médicos, enfermeras, personal que recibe muestras de los pacientes). Es menor el riesgo del personal que se desempeña dentro del laboratorio.

Ningún elemento de protección es tan necesario como la información, la organización en el trabajo, la concentración, el estado de alerta y la implementación de medidas de precaución muy simples y de poco costo

INFORMACIÓN Y CONTROL MÉDICO DEL PERSONAL DE LABORATORIO

- Los trabajadores de salud infectados con HIV, con otra enfermedad inmunosupresora, con tratamientos prolongados con medicamentos inmunosupresores (como corticoides) o diabéticos no deben trabajar en áreas de riesgo, en particular en el laboratorio de tuberculosis. Los que padecen enfermedades pulmonares crónicas deben contar con autorización de su médico para ser incorporados a las tareas del laboratorio.
- En el momento de ingreso, el personal deberá ser claramente instruido acerca de cómo se transmite la tuberculosis y las medidas de bioseguridad que deberá aplicar en su trabajo cotidiano. Para ello el laboratorio debe contar con un documento escrito que el personal debe leer. Debe ser evaluado el grado de comprensión, registrada la evaluación y archivada en su hoja de vida.
- Son necesarias las reuniones periódicas con todo el personal de laboratorio, destinadas a recordar las medidas de bioseguridad, analizar si se están cumpliendo con regularidad, dilucidar las causas de los accidentes que pudieran haberse producido y realizar las correcciones que fueran necesarias en la rutina de trabajo.
- Los laboratoristas deben ser incorporados a un programa regular de control médico para los trabajadores de salud, siguiendo la normativa laboral vigente en el país y las establecidas por el Programa Nacional de Control de Tuberculosis. Si no hubiera política adoptada o ésta no contemplara la vigilancia de infecciones por vía respiratoria, el supervisor debe asegurar que el personal de laboratorio tenga como mínimo una evaluación médica anual que puede incluir examen radiológico de tórax.
- Cuando el personal presente síntomas respiratorios por más de 15 días, se deberá disponer su examen médico, radiología de tórax y el examen por baciloscopia y cultivo de muestras de esputo.

- Cada laboratorio debe contar con instrucciones escritas y conocidas para la atención de pacientes con tuberculosis y el procesamiento de las muestras biológicas obtenidas de los mismos. En cada sección deben estar expuestas las normas básicas de bioseguridad específicas para cada tipo de tarea.
- El personal debe conocer quien es el supervisor responsable a quien le debe notificar inmediatamente cualquier accidente de trabajo.

PRECAUCIONES GENERALES DE TRABAJO

Básicamente es necesario aplicar todas las medidas lógicas para evitar la generación y movimiento de aerosoles que son el vehículo principal de transmisión de bacilos.

- Manipular el material potencialmente infeccioso en áreas alejadas de la circulación general. Restringir el acceso al laboratorio de personal ajeno al área de trabajo para evitar movimientos, corrientes de aire, distracciones y exposición de personas no involucradas. Atender al personal del centro de salud y pacientes fuera del área del laboratorio.
- No utilizar ventiladores ni acondicionadores que generen movimientos de aire en el área donde se manipula material potencialmente infeccioso, mientras se está trabajando.
- Al finalizar la tarea y antes de poner en funcionamiento ventiladores/acondicionadores de aire, desinfectar las superficies de mesadas donde se realizaron los extendidos y donde se colocaron recipientes con material potencialmente infeccioso, mantener el área cerrada durante media hora como mínimo y luego ventilar para eliminar vapores de fenol o cloro.
- Limpiar los pisos diariamente y las paredes semanalmente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,1%. No barrer ni limpiar superficies en seco, utilizar siempre un paño húmedo. No encerar. No levantar polvo al limpiar.
- No ubicar en el área de trabajo elementos innecesarios ni sacar registros o elementos allí utilizados.
- Utilizar siempre bata de mangas largas y cerrada;

no sacarla del centro de salud, donde debe ser lavada con jabón y agua caliente. La bata es útil para proteger de las sustancias químicas, colorantes y salpicaduras accidentales con muestras, pero no contra la infección por vía aerógena.

- No es necesario utilizar mascarillas de seguridad para realizar baciloscopias. Se puede considerar su uso si los recursos son suficientes y si se procesan más de 5 muestras diariamente. En caso de utilizarlas elegir mascarillas N95, es decir que aseguren al menos 95% de protección, que retengan partículas del orden de los 0,3 micrones o menos, que tengan cierre seguro por sobre la nariz y alrededor de la boca (deben cumplir las normas NIOSH). Las máscaras de cirugía dejan pasar el bacilo de la tuberculosis y dan una falsa sensación de seguridad. Las mascarillas deben ser de uso personal. Pueden ser reutilizadas hasta que se presente incomodidad para respirar debido a la saturación de sus poros, resisten aproximadamente 30 horas de uso. Deben ser guardadas en cajas muy limpias, no herméticas (ej de cartón), para evitar que se quiebren y que se obstruyan sus poros con polvo ambiental. Para que no se humedezcan, no guardarlas dentro de envolturas plásticas.
- Aunque son convenientes para protegerse de otras enfermedades que se transmiten por contacto, no es indispensable el uso de guantes para el trabajo con muestras de esputo., pero si muy aconsejable. Son necesarios los guantes para limpiar derrames, manipular desinfectantes. Se pueden utilizar los de uso doméstico. También son necesarios cuando hubiera heridas o excoiraciones en las manos
- Lavarse las manos con frecuencia, aun cuando se usen guantes.
- No tocar instalaciones, material de escritorio o equipamiento del laboratorio sin antes quitarse los guantes y lavarse las manos.
- **No beber, comer ni fumar en el área de trabajo donde se procesa material potencialmente infeccioso.**
- **No introducir en la boca, por ningún motivo, ningún elemento utilizado o existente en el laboratorio.**

PRECAUCIONES EN LA TOMA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se deben tomar en cuenta todas las recomendaciones hechas en este Manual al describir los procedimientos. En resumen:

- Recolectar las muestras de esputo en un lugar bien ventilado, nunca en el laboratorio, utilizando frascos de boca ancha y cierre hermético
- Evitar en lo posible las nebulizaciones, usar mascarillas de bioseguridad al realizar fibrobroncoscopías o nebulizaciones
- Comprobar que no haya derrames en las muestras; desinfectar el exterior del envase si los hubiera.
- Acondicionar y transportar las muestras en cajas que puedan ser desinfectadas, resistentes y con cierre hermético.
- Asegurar que los envases con muestras estén siempre en posición vertical.
- Si estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases con las muestras al menos durante 20 minutos antes de abrir las tapas, abrir cada tapa con cuidado y cerrarla herméticamente luego de tomar la muestra.
- Sistematizar el procesamiento de las muestras.
- Utilizar aplicadores para realizar los extendidos. Si se usa pipeta, elegir pipetas con peritas (bulbo) desechables, **no pipetear nunca con la boca**.
- Realizar movimientos lentos y suaves cuando se hacen los frotis.
- Disponer siempre de un frasco con fenol al 5% o de hipoclorito de sodio al 1%.
- Trabajar con un mechero entre los envases con las muestras y el operador al realizar los extendidos.
- Conservar los bordes de las láminas limpios, sin muestra.
- Colorear las láminas tan pronto estén secas y fijadas en la llama.
- Organizar el descarte seguro de los materiales utilizados en recipientes con tapas. Autoclavar o incinerar este material

MANIPULACIÓN Y USO DE DESINFECTANTES

Para tratar muestras y todo lo que haya estado en contacto con las ellas (aplicadores, derrames), usar fenol al 5% o hipoclorito de sodio (agua lejía o lavandina) al 1%. El tiempo mínimo de contacto sobre muestras que eventualmente contengan bacilos es 30 minutos.

Para la desinfección de superficies, utilizar hipoclorito de sodio al 1%. Sólo para la limpieza del piso se puede utilizar el hipoclorito al 0,1%.

La solución de hipoclorito de sodio de uso doméstico de buena calidad contiene 55g/l (5.5%) de cloro, puede variar entre el 3 y 6%. Por eso habitualmente se prepara cada solución de la siguiente forma:

- 1% : 1 parte de solución concentrada más 4 partes de agua
- 0,1% : 25 ml de solución concentrada por cada litro de agua

Elegir lejía o agua lavandina de buena calidad. Mantenerla al abrigo de la luz, en un lugar fresco y con la tapa bien cerrada para evitar que se deteriore. En los envases figura la fecha de envasado, debe ser controlada al adquirirlo. Las diluciones deben ser hechas inmediatamente antes de utilizar el desinfectante, porque pierde actividad rápidamente.

Tener en cuenta que el fenol es corrosivo y tóxico:

- Mantener el fenol concentrado en frascos con cierre hermético, en un lugar fresco, al abrigo de la luz y preferentemente en un lugar dedicado al almacenamiento alejado del área de trabajo.
- Mantener el fenol al 5% al alcance de la mano, pero en frascos con cierre hermético que evite que se escapen vapores.
- Evitar el contacto directo del fenol con la piel o mucosas. Utilizar guantes para manipularlo.
- Reducir los vapores de fenol que se desprenden de la fucsina ubicando la tinción de los extendidos en un área bien ventilada y limitando el número de extendidos a colorear a 12.

MANIPULACIÓN DE OTRAS SUSTANCIAS QUÍMICAS

- Manipular con mucho cuidado los ácidos concentrados. Agregar siempre el ácido al agua y no al revés
- No dejar envase con alcohol ni utilizarlo cerca de la llama del mechero para evitar que se prenda fuego y posibles quemaduras

PROCEDIMIENTOS FRENTE A UN ACCIDENTE DE TRABAJO

- Ante cualquier rotura de envases o tubos, o salpicadura con material potencialmente infeccioso, cubrir inmediatamente la zona con papel y embeberlo con fenol al 5% o con hipoclorito de sodio al 1%.
- Abandonar el área de trabajo por 30 minutos. Al regresar recoger el material y el papel que lo cubre con pinzas y depositarlo en un recipiente donde pueda ser incinerado o autoclavado.
- Si se produce herida cortante o punzante en el momento en que se está manipulando muestras, extendidos, o material descartado, lavarse las manos o zona afectada de inmediato con abundante agua y jabón y aplicarse inmediatamente etanol al 70-80%.
- Si se produce una salpicadura que afecte el ojo con material potencialmente infeccioso o un reactivo, lavarlo con agua destilada o solución fisiológica estériles utilizando un recipiente estéril aplicado sobre el ojo.
- Si se produce contacto con un ácido concentrado, lavar la zona y ropa afectada con abundante agua.
- Comunicar al supervisor el accidente luego de tomar las medidas descritas.
- Toda vez que se hubiera producido contacto de una muestra en la que se han detectado bacilos con una herida, o penetración cutánea o por mucosas, después del urgente lavado y limpieza local, debe ser consultado un médico para que controle al trabajador y disponga la administración de quimioprofilaxis si es pertinente.

ANEXO II PREPARACIÓN DE COLORANTES Y REACTIVOS

PARA LA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

Fucsina básica fenicada

Fucsina 3%

- Fucsina básica* 3 g
- Etanol 95° 100 ml

Disolver por agitación suave.

* Cloruro de pararosanilina, Pararosaniline Chloride, (*C19 H18 NCl*) mínimo contenido de colorante puro activo 88%. Si el contenido declarado fuera menor de este se debe hacer la corrección de la pesada, si figura 88% o más, no es necesaria la corrección de pesada.

Fenol 5%

- Cristales de fenol 5 g
- Agua destilada 100 ml

Disolver los cristales en el agua (puede ser preciso calentar suavemente)

Manipular el fenol con guantes y cuidadosamente.

Fucsina fenicada. Solución de trabajo

Combinar 10 ml de la solución de fucsina al 3% con 90 ml de la solución de fenol 5%, filtrar pasando por un embudo con papel de filtro antes de usar.=

Guardar todas las soluciones en frascos muy limpios, con cierre hermético

Rotularlos con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente, al abrigo de la luz.

Solución decolorante

Agregar siempre el ácido al alcohol, suavemente, y no al revés porque la temperatura de la solución aumenta explosivamente.

- Acido clorhídrico (35%) 30 ml
- Etanol 95° 970 ml

Mantener el envase herméticamente tapado.

Donde sea difícil adquirir alcohol, puede utilizarse la siguiente solución decolorante a base de ácido sulfúrico:

- Ácido sulfúrico concentrado (calidad técnica) 25 ml
- Agua destilada csp 100 ml

Agregar el ácido al agua, lentamente, agitando suavemente.

Rotular la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente.

Azul de metileno

- Cloruro de azul de metileno* 3 g
- Agua destilada 1000 ml

**Cloruro de metiltionina, Methylthionine Chloride. Contenido de colorante 82%*

Disolver el azul de metileno en el agua agitando suavemente, guardar la solución resultante en una botella color ámbar. Rotular la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente y filtrar antes de usar.

PARA LA TINCIÓN FLUORESCENTE

Solución de Auramina-O

Solución 1

Manipular la auramina con guantes, debe evitarse todo contacto porque es cancerígena.

- | | |
|--------------|-------|
| - Auramina | 0,1 g |
| - Etanol 95% | 10 ml |

Disolver la auramina en el etanol.

Solución 2

- | | |
|----------------------|-------|
| - Cristales de fenol | 3 g |
| - Agua destilada | 87 ml |

Disolver los cristales de fenol en el agua.

Mezclar las soluciones 1 y 2. Guardar el colorante así preparado en una botella color ámbar bien tapada, alejada del calor y de la luz. Rotular con el nombre Solución de Auramina-O y las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente no más de 3 meses. No filtrar con papel. Puede detectarse alguna turbidez que no afecta la coloración.

Solución decolorante

- | | |
|---------------------|--------|
| - Ácido clorhídrico | 0,5 ml |
| - Etanol 70% c.s.p. | 100 ml |

Agregar siempre el ácido al alcohol, suavemente, y no al revés porque la temperatura de la solución aumenta explosivamente. Rotular la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente.

Colorantes de contraste

Pueden usarse solución de permanganato de potasio o solución de naranja de acridina.

Solución de Permanganato de potasio

- | | |
|---------------------------|--------|
| — Permanganato de potasio | 0,5 g |
| — Agua destilada | 100 ml |

Disolver y guardar en una botella color ámbar bien tapada. Rotular con el nombre y las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente no más de 3 meses.

Solución de naranja de acridina

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| — Fosfato dibásico de sodio anhidro | 0,01 g |
| — Agua destilada | 100 ml |
| — Naranja de acridina | 0,01 g |

Disolver el fosfato de sodio en agua destilada. Agregar el naranja de acridina y disolver. Guardar el colorante así preparado en una botella color ámbar bien tapada alejada del calor y de la luz. Rotular con el nombre y las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente no más de 3 meses.

PRECAUCIONES

- Los colorantes, especialmente la fucsina básica, deben ser de buena calidad. Puede resultar conveniente que se realice una compra centralizada para garantizar buena calidad en todos los servicios de una jurisdicción. Verificar que la pureza de la fucsina sea superior a 88% y la del azul de metileno sea superior a 82%. Si no fuese así, deben ajustarse las cantidades teniendo en cuenta el grado de pureza. Ej.: si la pureza de la fucsina fuera 75%, divida 3g en $0.75=4$ g. Se pesarán 4 g en lugar de 3g.
- Utilizar guantes para manipular todos los reactivos
- Si la fucsina precipita hay que volver a filtrarla. Este procedimiento puede ser hecho sólo una vez, si precipita nuevamente hay que reemplazarla por un nuevo lote.
- Verificar que el fenol no esté pigmentado. Debe conservarse al abrigo de la luz para evitar su oxidación.
- Si bien los colorantes pueden ser utilizados durante 6 meses, es conveniente preparar los volúmenes que se han de consumir en no más de un mes. Todo reactivo con características anormales (llamativamente precipitado, turbio, etc), o conservado por más de 6 meses, debe ser descartado.

- Mantener todas las soluciones preferentemente en envases color ámbar, cerrados herméticamente y protegidos de la luz. Si no se dispone de frascos color ámbar, pueden ser envueltos en papel metálico. Lavar bien estos frascos antes de reutilizar enjuagándolos con alcohol o con la misma solución decolorante para disolver los cristales que pudieran haberse formado.
- Si se usan colorantes listos para usar preparados por la industria, consultar a los responsables de la Red de Laboratorios sobre su calidad ya que ésta es muy variable.
- Mantener un registro con la fecha de preparación, el volumen de cada reactivo que se ha preparado y el resultado del correspondiente control de calidad.

USO Y MANTENIMIENTO DE LA BALANZA

La balanza en la que se pesan los colorantes es un instrumento delicado y de precisión que debe ser utilizado con cuidado. Es recomendable que sólo pese hasta 200 g con precisión de 0,1g. Se debe consultar siempre el manual de uso.

- Ubicar la balanza en una mesa firme, libre de vibraciones y bien nivelada.
- Proteger la balanza de las corrientes de aire.
- Mantener siempre la balanza y las pesas (en el caso de utilizar una balanza de doble platillo) limpias y secas para protegerlas de la corrosión. Cualquier cambio en la superficie de cualquiera de las partes puede afectar la precisión.
- Tener en cuenta que la fucsina y el azul de metileno pueden manchar intensamente toda superficie donde caigan. No colocar el material a pesar directamente sobre el platillo sino sobre un recipiente o un papel apropiados. Pesar primero el recipiente o papel. Restar el peso del papel o recipiente del peso total con reactivos.
- Descargar los colorantes u otras drogas de a poco y muy suavemente hasta alcanzar el peso requerido. No volver a colocar excedentes en el envase original para evitar la contaminación de los productos contenidos en él.

- Al menos dos veces por año controlar la precisión de la balanza verificando el peso exacto de una pesa de 1g en muy buen estado de conservación, o una cantidad similar de un reactivo pesado previamente en otra balanza que se conoce que está bien calibrada.

CÁLCULO DE STOCK DE REACTIVOS

Con el objeto de asegurar un abastecimiento continuo de material de laboratorio, los laboratorios deben planificar las solicitudes de insumos para un período de tiempo. Es posible calcular los reactivos necesarios verificando en el registro del laboratorio el número de casos diagnosticados por baciloscopia durante el periodo determinado

El siguiente es un ejemplo de cómo se calcula el número de baciloscopias a realizar durante un trimestre tomando este parámetro.

Suponiendo que

- la proporción de casos detectados por baciloscopia entre los sintomáticos investigados es del 5% (es decir que entre 20 SR examinados se encuentra 1 caso con baciloscopia positiva)
- cada sintomático es investigado mediante 3 baciloscopias
- cada caso de tuberculosis con baciloscopia positiva es evaluado con 6 exámenes de control
- se han diagnosticado aproximadamente 10 casos por baciloscopia en un trimestre

Será necesario realizar 66 baciloscopias por cada caso detectado por baciloscopia, según se obtiene con el siguiente cálculo:

- $(1 \text{ caso de tuberculosis} + 19 \text{ SR negativos}) \times 3 = 60 \text{ baciloscopias de diagnóstico}$
- $1 \text{ caso de tuberculosis} \times 6 \text{ baciloscopias} = 6 \text{ baciloscopias de control de tratamiento}$

Es decir que para un trimestre será necesario calcular que el stock de reactivos sea suficiente para realizar 660 baciloscopias

Si no se prevé modificaciones en la actividad de detec-

ción de casos, el total de baciloscopias a realizar también puede ser estimado simplemente consultando el total de baciloscopias realizado durante el trimestre anterior

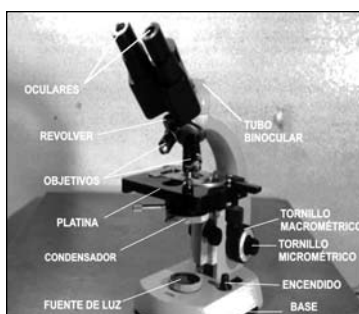
Es conveniente calcular el stock necesario agregando

un mes adicional de trabajo para cubrir imprevistos en la carga de trabajo o retrasos en la entrega de los insumos. En el ejemplo anterior a las 660 baciloscopias calculadas, se le sumarian 220 más, lo que hace un total de 880 baciloscopias.

	Cantidad necesaria por baciloscopia a realizar a	Stock para un trimestre b = a x 880	Cantidad a solicitar (redondeo)
Envase para muestras	1	880	900
Portaobjetos	1	880	900
Aplicadores	1	880	900
Aceite de inmersión	0,05 ml	44 ml	50 ml
Fucsina básica	0,015 g ó 3 ml si recibe el colorante preparado	13,5 g ó 2640 ml	15 g ó 2,7 litros
Alcohol 95°	5,85 ml	5148 ml	5 litros
Fenol en cristales	0,25 g	22 g	25 g
Ácido clorhídrico	0,15 ml ó 5 ml si recibe el reactivo preparado	135 ml ó 4400ml	140 ml ó 4,5 litros
Ácido sulfúrico	1,25 ml	1.100 ml	1,10 litro
Azul de metileno	0,005 g ó 3 ml si recibe el colorante preparado	1,35 g ó 2640 ml	1,5 g ó 2,6 litros
Xilol	3 ml	2640 ml	2,7 litros
Papel de filtro	Un rollo por mes		
Solución de hipoclorito de sodio	0,1 ml de solución doméstica	88 ml	100 ml
Lámpara para microscopio	Una por año		

Como el ojo humano no puede ver los objetos de una dimensión menor que 0,1mm, es necesario magnificar a las bacterias para que puedan detectarse. Esto es posible con un microscopio. Quedan magnificadas tantas veces como resulta multiplicar el aumento del objetivo por el aumento del ocular del microscopio.

Del buen estado y buen uso del microscopio depende la calidad de la baciloscopia. Debe ser operado con mucha delicadeza. Todo el personal de laboratorio que lo utilice debe estar entrenado para manejarlo y mantenerlo, sabiendo para qué sirve cada una de las piezas que lo componen. Movimientos bruscos o sin sentido, restos de aceite de inmersión, el polvo, cualquier tipo de suciedad y la humedad afectan al equipo y ponen en peligro la precisión del examen microscópico.



COMPONENTES

Parte mecánica

La base o el pie del microscopio que sirve de sostén a la platina en la que se coloca el portaobjetos debe ser lo suficientemente pesada como para que el aparato sea estable. La platina tiene abrazaderas para sujetar el portaobjetos y un vernier que permite ubicar un campo determinado. Los movimientos en línea horizontal y vertical de esa abrazadera se controlan mediante dos tornillos. El brazo sostiene el portaoculares y un revólver portaobjetivos que permite ubicar lentes con varios aumentos y puede ser reemplazado en caso necesario. En el microscopio binocular los dos oculares pueden ser aproximados o separados para adaptar su posición a la distancia entre las pupilas del observador.

Un tornillo grueso (macro) permite subir y bajar el brazo con movimientos amplios y otro más pequeño (micro), con movimientos muy sutiles, de manera que es posible ajustar la posición del objetivo durante el examen.

Elementos ópticos y de iluminación

Para el examen de los frotis teñidos mediante la técnica de Ziehl Neelsen se recomienda utilizar un microscopio binocular es decir, un microscopio con dos oculares 8 ó 10 x . Se requiere además un objetivo con lente retráctil de inmersión 100 x, de manera que combinados magnifiquen 800 ó 1000 aumentos.

El espejo con dos caras, una plana y otra cóncava, direcciona un haz de luz de la fuente de iluminación al eje óptico del microscopio.

Por lo general, la fuente de iluminación está fijada al pie del microscopio y utiliza una bombilla de halógeno, pequeña y de gran intensidad. También pueden emplearse lámparas con filamento de tungsteno. Las lámparas resisten un número limitado de horas de uso, por lo que siempre hay que tener al menos una de repuesto. La fuente permite aumentar o disminuir la intensidad de la iluminación. La fuente de iluminación tiene un diafragma que puede ser abierto o cerrado girando un anillo, para dispersar o concentrar el haz de luz respectivamente.

Si no se dispone de electricidad, debe usarse luz natural como fuente de iluminación colocando el microscopio frente a una ventana que permita entrar la luz solar plenamente.

El condensador es una lente ubicada debajo de la platina. Esta lente concentra la luz en el portaobjetos. En esta pieza hay un tornillo que permite subir y bajar esta lente, y otros dos, generalmente más pequeños, que permiten mover el haz de luz que pasa por el condensador. El condensador tiene su propio diafragma que permite dispersar o concentrar el haz de luz que pasa por él y, generalmente, es operado con una palanquita.

MANEJO

Centrado de la iluminación

Con el siguiente procedimiento es posible centrar la iluminación del microscopio sobre el campo de observación del frotis, para evitar la refracción y obtener la mejor imagen posible.

- Enchufar el microscopio, si se utiliza electricidad, o de lo contrario captar con el espejo la luz natural.
- Enfocar lo mejor posible un frotis con la lente de inmersión que va a ser utilizada (ver más abajo).
- Cerrar totalmente el diafragma de la fuente de iluminación.
- Identificar un círculo de luz al mirar por los oculares. Si el campo está totalmente oscuro, el haz de luz

está muy descentrado. Proceder con los siguientes pasos.

- Suave y lentamente, girar los tornillos del condensador hasta que el haz de luz aparezca y esté centrado en el campo de observación.
- Suave y lentamente, mover la posición del condensador hacia arriba y abajo hasta encontrar la posición en la que el borde del haz de luz sea lo más nítido posible.
- Abrir el diafragma del condensador dos terceras partes de la apertura total.
- Abrir el diafragma de la fuente de iluminación hasta que el haz de luz alcance los bordes del campo de observación, no más que eso.
- La intensidad de la luz de la lámpara puede ser regulada según la preferencia del microscopista. También es posible agregar un filtro sobre la fuente de iluminación para suavizarla.
- Una vez centrada la iluminación, no mover ni los diafragmas ni el condensador hasta que se detecte que es necesario repetir el procedimiento porque la imagen es refringente o imprecisa. Si se opera con delicadeza el microscopio, no es necesario repetir el centrado sino después de varios días o aun meses de trabajo.

Enfoque y control de la limpieza

- Verificar que las lentes, los espejos y otras superficies que transmiten luz estén limpios.
- Con el tornillo macro, subir el revólver con sus objetivos.
- Girar el revolver portaobjetivos hasta ubicar la lente de inmersión en posición para ser utilizada.
- Tomar un extendido positivo para controlar el funcionamiento del microscopio y la calidad de la coloración del día.
- Verificar que el material extendido y coloreado esté hacia arriba.
- Apoyando el portaobjetos sobre la mesa **dejar caer** una gota de aceite de inmersión sobre el frotis coloreado, en su parte más cercana al número. No tocar el extendido con la punta del gotero o varilla.

para evitar transferir material de un extendido a otro y generar falsos resultados positivos.

- Verificar que la cara inferior de la lámina esté bien limpia.
- Ubicar la lámina en la platina y asegurarla con la abrazadera.
- Mover la platina con los tornillos correspondientes en las cuatro direcciones posibles para verificar que el desplazamiento se produce sin dificultad.
- Ubicar luego la gota de aceite justo debajo de la lente de inmersión.
- Bajar la lente de inmersión lentamente con el tornillo macro hasta que toque ligeramente el aceite (controlar el movimiento para evitar romper la lámina)
- Observar a través de los oculares y continuar bajando muy suave y lentamente hasta ver microorganismos o células coloreadas en el extendido.
- Ajustar suavemente el tornillo micro hasta ver la imagen nítida.
- Verificar si se observan “artefactos”, es decir cuerpos extraños, o BAAR que se mueven anormalmente
 - Si los artefactos o BAAR se mueven libremente y pasan bajo la mirada del observador sin que pueda detenerlos, pueden ser restos provenientes de otra baciloscopia que fueron arrastrados por el aceite de inmersión. Limpiar el aceite del objetivo. Verificar que no esté contaminado el aceite contenido en el frasco en uso volviendo a enfocar otro preparado con una nueva gota de aceite
 - Si los artefactos se mueven cuando se desplaza el portaobjetos, pueden ser precipitados o suciedad incorporada accidentalmente en el frotis.
 - Si solo se mueven cuando se gira el ocular, se trata de suciedad que está en el ocular, proceder a limpiarlo.
 - Si no se mueven, la suciedad o bacilos contaminantes puede estar en los objetivos, el condensador, el espejo o la fuente de iluminación, proceder a limpiarlos.

CUIDADOS

- El microscopio debe estar ubicado siempre en un ambiente seco (el moho puede crecer sobre las lentes), libre de polvo y sobre una superficie sin vibraciones.
- No retirar las láminas sin levantar antes el revólver con el objetivo, para no rayar las lentes.
- Si no está en uso, guardarlo en una caja con gel de sílice; cuando el gel cambie su color de celeste a rosa se ha humedecido, debe ser restaurado calentándolo en estufa con atmósfera seca.
- Limpiar con papel para lentes o pañuelos de papel suaves la óptica del microscopio. No utilizar solventes (alcohol, xileno, benceno, acetona) para limpiar los objetivos a menos que la suciedad sea resistente a la limpieza con papel. Estos solventes pueden disolver los pegamentos de las lentes y permitir que el aceite de inmersión penetre en ellas
- Al terminar las lecturas del día, cubrir el microscopio con su funda.
- El mantenimiento debe ser realizado por personal técnico especializado. El mantenimiento preventivo debe ser programado para interferir lo mínimo posible con el trabajo de rutina, debe ser periódico, al menos anual. El correctivo (reparaciones y reemplazo de piezas dañadas del microscopio) es eventual.

ANEXO IV MODELOS DE FORMULARIOS

SOLICITUD DE BACILOSCOPIA DE ESPUTO

Establecimiento⁽¹⁾ Fecha:/...../.....

Apellido y nombres del paciente:

Edad: Sexo: F ☐ M ☐ Numero de registro:

Dirección completa del paciente:
.....

Motivo del examen:

Para Diagnóstico ☐ muestra 1ª ☐ 2ª ☐ 3ª ☐ ... ☐

Para control de tratamiento ☐ mes de tratamiento.....

Historia de tratamiento antituberculoso:

no ha sido tratado anteriormente ☐

tiene tratamiento(s) previo(s) ☐

Nombre del solicitante:

Firma:

(1) Incluye a todos los proveedores de salud (públicos, privados, del seguro de salud, sistema penitenciario, etc)

RESULTADO DE LA BACILOSCOPIA

(A ser completado en el laboratorio)

Método Ziehl Neelsen ☐

Fecha de recoleccion	Muestra	Aspecto (*)	Resultado				
			negativo	Positivo			
				1 a 9 BAAR	+	++	+++
	1						
	2						
	3						

(*) Saliva, mucopurulenta, sanguinolenta , licuada

Examinado por:

Firma:

Fecha:

Servicio de salud:
Domicilio:

S: Saliva
MP: Mucupurulenta
Sang: Sanguinolenta
L: Licuada

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

PLANILLA DE CONTROL DE REACTIVOS DE COLORACIÓN

Fecha			Observación microscópica								Medidas implementadas
Colorante	Preparación	Vencimiento	Control	Frotis positivo				Frotis negativo			
				Lectura	Coloración bacilos 1	Cristales o precipitados 2	Coloración fondo 1	Lectura	Cristales o precipitados 2	Coloración fondo 1	

1 Consignar buena o mala
2 Consignar sí o no

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO
PLANILLA DE SEGUIMIENTO DE RESULTADOS INFORMADOS POR EL LABORATORIO DE REFERENCIA

Año	Mes	Tipo de supervisión		Baciloscopias (re) leídas				Buenas/buenos			Medidas correctivas implementadas
				positivas		negativas		Muestras %	Extendidos %	Coloraciones %	
		1	2	Nº	concordancia %	Nº	concordancia %				

- 1** Relectura de láminas en el laboratorio de referencia
2 Lectura de un panel de frotis recibido del laboratorio de referencia

PEDIDO TRIMESTRAL DE SUMINISTROS PARA EL LABORATORIO

Establecimiento

Trimestre

Año

Nombre del responsable

Fecha

		Consumo trimestral promedio	Reserva necesaria en la unidad	Reserva existente en la unidad	Solicitado
		a	b	c	d= a+b-c
Envase para muestras	unidad				
Portaobjetos	unidad				
Aplicadores	unidad				
Aceite de inmersión	ml				
Si prepara los reactivos					
Fucsina básica	g				
Alcohol 95 °	ml				
Fenol en cristales	g				
Ácido clorhídrico	ml				
Ácido sulfúrico	ml				
Azul de metileno	g				
Xilol	ml				
Si recibe reactivos preparados					
Colorante (fucsina)					
Solución decolorante					
Colorante de fondo (azul de metileno)					
Papel de filtro	unidad/rollo				
Solución de hipoclorito de sodio	ml				
Lámpara para microscopio	unidad				



**Organización
Panamericana
de la Salud**

*Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud*



USAID
DEL PUEBLO DE LOS ESTADOS
UNIDOS DE AMÉRICA