



# MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS



Costa Rica  
2016

*Elaborado por*

**INCIENSA**

Carlos Trabado Alpízar  
Estela Cordero Laurent  
Rafael Garita Alvarado  
Milena Brenes Calvo

*Validado por*

**CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL**

Vilma Carvajal Gutiérrez  
Víctor Hugo Alvarado  
Pedro Carrillo Dover  
Maria Fernanda Matamoros Madrigal  
Yenzie Robinson Mitchell

**PROGRAMA NACIONAL PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS, CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL**

Zeidy Mata Azofeifa  
Ana María Jiménez Solís

**MINISTERIO DE SALUD**

Hilda Salazar Bolaños

**MINISTERIO DE JUSTICIA Y PAZ**

Dixiana Alfaro Alvarado

616.995

M924m Costa Rica. Ministerio de Salud

Manual de normas y procedimientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis 2016.- San José, Costa Rica: Grupo Técnico Nacional de Tuberculosis, 2016.

82 p.; Pdf

ISBN 978-9977-62-169-2

1. Salud Pública. 2. Tuberculosis. 3. Costa Rica. I. Título.

## Presentación

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa y una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Es una patología que se ha mantenido presente por siglos y afecta a todos los estratos sociales. En la última década enfatiza su importancia por el surgimiento de un nuevo reto como es la multirresistencia a los antimicrobianos usuales para su tratamiento. Esto sumado a los problemas inherentes a la enfermedad como son el incremento de condiciones de pobreza, la necesidad de tratamientos con múltiples drogas por periodos prolongados, el debilitamiento de los programas de control de la misma y el surgimiento de la pandemia del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), hacen que la tuberculosis sea una prioridad para la Salud Pública costarricense.

Este manual para el laboratorio representa un importante eslabón en el conjunto de acciones iniciadas por el Ministerio de Salud, el Inciensa y la Caja Costarricense del Seguro Social en 1997 y tiene como propósito servir a los Laboratorios Clínicos del país como guía y consulta en el diario quehacer y, de esta manera estandarizar procedimientos que apoyen la calidad y oportunidad del diagnóstico de este padecimiento.

Estamos seguros de que el esfuerzo cotidiano de todos los profesionales y técnicos de los laboratorios clínicos del país, no sólo contribuirá para que Costa Rica siga logrando la disminución de la incidencia de la tuberculosis en la próximos años sino también, para que podamos avanzar hacia su erradicación con el apoyo de los funcionarios de las diferentes instituciones y la comunidad..

  
Dr. Fernando Llorca Castro  
Ministro de Salud



# Contenido

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2. ORGANIZACIÓN DE LA RED NACIONAL DE LABORATORIOS</b>          | <b>6</b>  |
| <b>3. DEFINICIÓN OPERATIVA DE CASO (PERSONAS DE 10 AÑOS Y MÁS)</b> | <b>9</b>  |
| <b>4. MUESTRAS</b>   | <b>9</b>  |
| 4.1 CANTIDAD DE MUESTRAS Y MOMENTO PARA SU RECOLECCIÓN             | 10        |
| 4.2 ESPUTO   | 11        |
| 4.3 OTRAS MUESTRAS   | 15        |
| <b>5. BACILOSCOPIA</b>   | <b>18</b> |
| 5.1 CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE BACILOSCOPIAS                    | 19        |
| 5.2 PREPARACIÓN Y FIJACIÓN DEL EXTENDIDO                           | 19        |
| 5.3 TINCIÓN  | 23        |
| 5.3.1 EL ZIEHL NEELSEN   | 23        |
| 5.3.2 TINCIÓN FLUORESCENTE   | 24        |
| 5.4 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA                                       | 25        |
| 5.4.1 LECTURA DE EXTENDIDOS COLOREADOS POR ZIEHL NEELSEN           | 26        |
| 5.4.2 LECTURA DE FROTIS COLOREADOS CON FLUOROCROMOS                | 29        |
| 5.5 INFORME DE RESULTADOS  | 30        |
| 5.6 CONSERVACIÓN DE LÁMINAS  | 31        |
| 5.7 OPERACIONAL  | 32        |
| <b>6. CULTIVO</b>  | <b>32</b> |
| 6.1 DESCONTAMINACIÓN: PETROFF                                      | 32        |
| 6.2 CONTROL DE CALIDAD DEL PROCESO DE DIGESTIÓN-DESCONTAMINACIÓN   | 33        |
| 6.3 CULTIVO DE LAS MUESTRAS  | 34        |
| 6.4 REVISIÓN PERIÓDICA DE LOS TUBOS                                | 35        |
| 6.5 REPORTE DE CULTIVOS SIN CRECIMIENTO:                           | 36        |
| 6.6 ENVÍO DE CULTIVOS AL CNRM                                      | 36        |
| 6.7 INFORME DE RESULTADOS:   | 37        |
| 6.8 PRECAUCIONES PARA PROCESAR CULTIVOS POSITIVOS                  | 39        |
| <b>7. PRUEBAS MOLECULARES</b>                                      | <b>41</b> |
| <b>8. BIOSEGURIDAD EN EL TRABAJO CON MICOBACTERIAS</b>             | <b>43</b> |
| 8.1 DESCONTAMINACIÓN Y DESECHO DEL MATERIAL                        | 43        |
| 8.2 PRECAUCIONES GENERALES DE TRABAJO                              | 43        |
| 8.3 PRECAUCIONES EN LA TOMA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS         | 45        |
| 8.4 MANIPULACIÓN Y USO DE DESINFECTANTES                           | 45        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>9. PROCEDIMIENTOS FRENTE A UN ACCIDENTE DE TRABAJO</b>   | <b>46</b> |
| 9.1 PLAN DE CONTINGENCIA PARA ACCIDENTES DE TRABAJO   | 47        |
| <b>10. INFORMACIÓN Y CONTROL MÉDICO DEL PERSONAL DE LABORATORIO</b>   | <b>47</b> |
| <b>11. SUPERVISIÓN</b>  | <b>48</b> |
| 11.1 SUPERVISIÓN INDIRECTA  | 48        |
| 11.2 SUPERVISIÓN DIRECTA MEDIANTE INSPECCIONES DE CALIDAD   | 50        |
| <b>12. NORMAS PARA EL ÁREA FÍSICA Y EL EQUIPO DEL LABORATORIO QUE PROCESA MUESTRAS POR TUBERCULOSIS.</b>  | <b>50</b> |
| 12.1 INDUMENTARIA Y EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPP)   | 51        |
| 12.2 PRECAUCIONES GENERALES PARA EL PROCESAMIENTO DE MUESTRAS   | 51        |
| 12.3 PROCESAMIENTO Y DESECHO DE MATERIAL CONTAMINADO  | 52        |
| 12.4 UTILIZACIÓN DE TUBOS QUE EMITEN LUZ UV   | 53        |
| 12.5 MANTENIMIENTO DE LA HIGIENE DE REFRIGERADORES Y ESTUFAS DE CULTIVO   | 54        |
| <b>13. PRECAUCIONES PARA LA DERIVACIÓN DE CULTIVOS POSITIVOS AL CNRM</b>  | <b>54</b> |
| <b>14. ANEXOS</b>   | <b>56</b> |
| 1. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB: BÚSQUEDA PASIVA   | 57        |
| 2. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB: BÚSQUEDA ACTIVA   | 57        |
| 3. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A MEDICAMENTOS DE PRIMERA LÍNEA EN CASOS NUEVOS.  | 58        |
| 4. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A MEDICAMENTOS DE PRIMERA LÍNEA EN CASOS NUEVOS EN GRUPOS DE RIESGO: INDÍGENAS, PRIVADOS DE LIBERTAD. | 60        |
| 5. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A MEDICAMENTOS DE PRIMERA LÍNEA EN CASOS ANTES TRATADOS.  | 61        |
| 6. DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA A DROGAS DE SEGUNDA LÍNEA EN PACIENTES CON MULTIRRESISTENCIA.   | 62        |
| 7. PREPARACIÓN DE COLORANTES Y REACTIVOS  | 63        |
| 8. USO Y MANTENIMIENTO DE LA BALANZA  | 66        |
| 9. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS; INSTRUCCIONES PARA EL PACIENTE  | 67        |
| 10. REQUISITOS MÍNIMOS PARA EL ÁREA DE TRABAJO PARA BACILOSCOPIÁS POR BK  | 67        |
| 11. CONTROL MÉDICO  | 69        |
| 12. ATENCIÓN DE ACCIDENTES  | 70        |
| 13. REGISTRO PARA CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE REACTIVOS DE COLORACIÓN   | 71        |
| 14. REGISTRO PARA CONTROL DE CALIDAD EXTERNO  | 72        |
| 15. REQUISITOS ESPECÍFICOS DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE MUESTRAS   | 73        |

## Glosario

**BAAR**

Bacilo alcohol ácido resistente o bacilo ácido alcohol resistente

**CBS**

Cámara de bioseguridad o seguridad biológica

**CCSS**

Caja Costarricense de Seguro Social

**CNRM**

Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología del INCIENSA

**EBAIS**

Equipos Básicos de Atención Integral en Salud

**EPP**

Equipo de protección personal

**Espuito**

Secreción que se produce en los pulmones y bronquios, expulsado mediante la tos, contiene moco, restos celulares o microorganismos y, en ocasiones, sangre o pus

**LUV**

Lámpara ultravioleta

**MJP**

Ministerio de Justicia y Paz

**MS**

Ministerio de Salud

**PICTB**

Programa Institucional para el Control de la Tuberculosis de la CCSS

**PNCTB**

Programa Nacional para el Control de la Tuberculosis, MS

**SR**

Sintomático Respiratorio

**TB**

Tuberculosis.

**TBP**

Tuberculosis pulmonar.

**UV**

Ultravioleta

## 1. Introducción

Conforme al Plan para Detener la Tuberculosis<sup>1</sup> de la Organización Mundial de la Salud y la Alianza Alto a la Tuberculosis, cada país debe contar con pruebas diagnósticas que hagan posible una detección rápida, económica y eficaz de los casos de tuberculosis activa, así como identificar con precisión a las personas con infección latente y a las que sufran un alto riesgo de desarrollo de la enfermedad.

El objetivo más importante es alcanzar una reducción sostenida de la prevalencia y de la mortalidad por tuberculosis, como único camino para conseguir la eliminación de esta enfermedad como problema de salud pública (1 caso por millón de habitantes). El diagnóstico de laboratorio es indispensable para confirmar la sospecha clínica de la TB, de ahí la importancia de que la red nacional de laboratorios funcione eficientemente.

Es por lo anterior que la calidad en el diagnóstico de laboratorio debe ser entendida como factor crítico para alcanzar las metas establecidas.

El Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología del Inciensa, es el responsable de coordinar el funcionamiento de la red nacional de laboratorios, asegurar la calidad del diagnóstico de la tuberculosis en el ámbito nacional y la vigilancia de la TB basada en el laboratorio.

La red de laboratorios está estructurada en diversos niveles entrelazados por objetivos comunes y debe mantener un flujo continuo de información con el Centro Nacional de Referencia y suministrar los datos que éste requiera para el cumplimiento de sus objetivos.

Nuestro principal interés para la publicación de este nuevo manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, es que la red nacional de laboratorios cuente con una herramienta práctica y actualizada, que pueda consultar para su aplicación en el trabajo cotidiano.

Este nuevo manual ha surgido de la urgencia por actualizar el manual de normas vigente desde 1999<sup>2</sup> y de una revisión de las partes 1 y 2, para la baciloscopía y el cultivo, del manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, de la Organización Panamericana de la Salud, publicado en 2008<sup>3</sup> y del que se tomó gran parte del contenido de este manual.

Asimismo y hasta donde ha sido posible, se han evitado duplicidades entre la información que aparece en este manual y la Norma para la Atención Integral de la Tuberculosis, enfocándonos en la actividad sustantiva de un Laboratorio Clínico.

---

<sup>1</sup> Alianza Alto a la Tuberculosis y Organización Mundial de la Salud. Plan Mundial para Detener la Tuberculosis 2006-2015. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, 2006 (WHO/ HTM/ STB/ 2006,35)

<sup>2</sup> Manual de normas y procedimientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: Para uso en los laboratorios de I y II nivel de atención. 2da edición. 1999

<sup>3</sup> Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Organización Panamericana de la Salud. 2008

## 2. Organización de la Red Nacional de Laboratorios

Todos los componentes de la red tienen responsabilidad y se complementan para asegurar el acceso al diagnóstico bacteriológico rápido y confiable. Todas las unidades de salud deben recibir muestras de los SR o sintomáticos. Los laboratorios deben estar integrados a los programas de garantía de calidad del CNRM.

### *Unidades de recolección de muestras*

Estas unidades están conformadas por EBAIS y otros centros de atención que no cuentan con Laboratorio. Podrán captar las muestras de su área de atención y referirlas al Laboratorio de la red de servicios que le corresponda.

### *Laboratorios de Primer Nivel*

Se refiere principalmente a Áreas de Salud y que no realizan cultivos. Sus funciones son:

- Capacitar al personal de salud en lo concerniente a la técnica de recolección y manejo de muestras de esputos.
- Brindar la información relevante a los pacientes, tanto oral como escrita, acerca de la recolección de muestras de esputo y asegurarse de que cada paciente la ha comprendido.
- Tener siempre a disposición el material necesario para la recolección de las muestras de esputo (frascos, instrucciones escritas, etc.), ver apartado 4.2 y anexo 9.
- Contar con las condiciones necesarias para garantizar la bioseguridad en el procesamiento de muestras para TB, de acuerdo a su alcance y tipo de centro de salud. Ver requisitos mínimos de laboratorio para el procesamiento de muestras por TB, en anexo 10.
- Participar activamente en actividades propias del programa de TB, en cuanto a prevención y otros aspectos.
- Realizar baciloscopías de las muestras de su área de atracción y de las referidas por otras áreas.
- Registrar y mantener al día la información según se indica en la normativa.
- Reportar los resultados de las baciloscopías conforme a la normativa.
- Enviar mensualmente al CNRM la totalidad de las baciloscopías que resultan positivas y el 5% de las negativas, con la boleta de solicitud de confirmación diagnóstica (Solicitud de Confirmación Diagnóstica de Baciloscopías USTL-R03) debidamente llena y que se encuentra en la página WEB: <http://www.Inciensa.sa.cr/Inciensa/Formularios.aspx>. En caso de que el 5% de las baciloscopías negativas no alcance a una lámina por mes, enviar la baciloscopía negativa en cuanto sea reportada y anotarlo como observación en la boleta de solicitud de confirmación diagnóstica. Las baciloscopías deben ser enviadas al CNRM en la primera semana del mes



siguiente al que fueron tomadas las muestras y de ser posible, el mismo mes. En caso de requerir una confirmación urgente, la muestra puede enviarse al CNRM inmediatamente.

- Participar y brindar las facilidades necesarias para las inspecciones de calidad que el CNRM programe.
- Participar de las evaluaciones del desempeño que el CNRM programe.
- Participar de las capacitaciones, reuniones y actividades en general que el CNRM programe.

### ***Laboratorios de Segundo Nivel***

Por lo general, hospitales periféricos, regionales, nacionales y especializados; que realizan cultivos. Sus funciones son:

- Brindar la información relevante a los pacientes, tanto oral como escrita, acerca de la recolección de muestras de esputo y asegurarse de que la ha comprendido.
- Tener siempre a disposición el material necesario para la recolección de las muestras de esputo (frascos, instrucciones escritas, etc.), ver apartado 4.2 y anexo 9.
- Realizar baciloscopías de las muestras de su área de atracción y las referidas por otras áreas que no cuenten con laboratorio clínico, o que por una situación especial, así lo requieran.
- Contar con las condiciones necesarias para garantizar la bioseguridad en el procesamiento de muestras para TB, de acuerdo a su alcance y tipo de centro de salud. Ver requisitos mínimos de laboratorio para el procesamiento de muestras por TB y Requisitos del laboratorio de procesamiento de muestras y aislamientos en anexos 10 y 15.
- Realizar cultivos de las muestras cuando corresponda, conforme a los diagramas de flujo que se indican en este manual y a las directrices emanadas por las autoridades de Salud, en caso de contar con la infraestructura necesaria y con la aprobación del CNRM.
- Cultivar las muestras recibidas de búsquedas activas en zonas o grupos de riesgo (centros penitenciarios, asentamientos humanos, áreas indígenas y migrantes) cuya baciloscopía resulte negativa. Salvo contraindicación de las autoridades del PNCTB.
- Registrar y mantener al día la información según se indica en la normativa.
- Reportar los resultados de las baciloscopías, cultivos y otros, conforme a la normativa.
- Enviar mensualmente al CNRM la totalidad de las baciloscopías que resultan positivas y el 5% de las negativas, con la boleta de solicitud de confirmación diagnóstica (Solicitud de Confirmación Diagnóstica de Baciloscopías USTL-R03) debidamente llena y que se encuentra en el sitio: <http://www.Inciensa.sa.cr/Inciensa/Formularios.aspx>. En caso de que el 5% de las baciloscopías negativas no alcance a una lámina por mes, enviar la baciloscopía negativa en cuanto sea reportada y anotarlo como observación

en la boleta de solicitud de confirmación diagnóstica. Las baciloscopías deben ser enviadas al CNRM en la primera semana del mes siguiente al que fueron tomadas las muestras y de ser posible, el mismo mes. En caso de requerir una confirmación urgente, la muestra puede enviarse al CNRM inmediatamente.

- Enviar la totalidad de los cultivos que resulten positivos, acompañados de la boleta de solicitud que corresponde, debidamente llena: Solicitud de Diagnóstico USTL-R01 que pueden bajar del sitio WEB del Inciensa: <http://www.Inciensa.sa.cr/Inciensa/Formularios.aspx>.
- Participar y brindar las facilidades necesarias para las inspecciones de calidad que el CNRM programe.
- Participar de las evaluaciones del desempeño que el CNRM programe.
- Participar de las capacitaciones, reuniones y actividades en general que el CNRM programe.
- Participar de proyectos especiales que programen la CCSS, el MS, el MJP y el Inciensa.
- Notificar de manera inmediata, vía telefónica y electrónica, los resultados de las pruebas de resistencia que resulten positivas a los responsables del PICTB y al PNCTB, así como al neumólogo tratante del establecimiento de salud y enviar al CNRM la muestra que corresponda para confirmación o ampliación del diagnóstico.

**NOTA: Las muestras de esputo y otras enteras deben ser procesadas en los laboratorios de primer y segundo nivel. El CNRM NO RECIBIRÁ estos tipos de muestra salvo en casos especiales y a solicitud de los responsables del Programa de TB de la CCSS o del MS**

Independientemente de que el Laboratorio sea de primer o segundo nivel, si cuenta con pruebas moleculares para el diagnóstico de TB, deberá enviar al CNRM, todas las muestras que resulten positivas, para confirmación o ampliación del diagnóstico (ver Apartado 7)

### ***Laboratorio de Tercer Nivel***

Se refiere al CNRM. Sus funciones son:

- Realizar baciloscopías, identificaciones de micobacterias tuberculosas y ambientales, así como pruebas de resistencia a drogas antituberculosas.
- Realizar determinaciones de Adenosina desaminasa (ADA) o cualquier otra que la sustituya en el diagnóstico de derrames pleurales o meningitis tuberculosas.
- Normar las técnicas de diagnóstico para su aplicación por los laboratorios de la red.

- Mantener un flujo de información continuo con los laboratorios de la red y las autoridades de la CCSS y del MS.
- Procesar los datos que recibe de los laboratorios de la red y del resultado de los análisis para mantener informadas a las autoridades de salud sobre la situación de la TB en Costa Rica.
- Aplicar de manera constante un sistema de aseguramiento de la calidad para los laboratorios que hacen diagnóstico de la tuberculosis.
- Brindar informes de resultados del programa de aseguramiento de la calidad a las autoridades competentes.
- Controlar la calidad de los reactivos de tinción empleados por la red de laboratorios.
- Capacitar al personal de la red de laboratorios de TB.
- Notificar de manera inmediata vía telefónica y electrónica, los resultados de las pruebas de resistencia (mono, poli, MDR y XDR) a los responsables del PICTB y del PNCTB, así como al neumólogo tratante del establecimiento de salud.

### 3. Definición operativa de caso (personas de 10 años y más)

#### ***Sintomático respiratorio –SR- (casos con sospecha de TBP)***

Toda persona de 10 años o más que consulta a un establecimiento de salud por cualquier causa, o identificado por el técnico de atención primaria durante la visita domiciliar y al interrogatorio manifiesta: *tos con expectoración de dos o más semanas de evolución.*

#### ***Sintomático***

En zonas y grupos de riesgo la definición de caso sintomático contemplará únicamente: *tos con expectoración, sin tomar en cuenta el número de días de evolución de ésta.*

**No todas las personas infectadas enferman, solamente las más susceptibles, aproximadamente una de cada diez.**

### 4. Muestras

De la calidad de la muestra que ingresa al laboratorio, depende la confiabilidad y alcance de sus resultados. Las muestras que recibe el laboratorio deben haber sido tomadas adecuadamente, estar debidamente identificadas, en cantidad suficiente para llevar a cabo los análisis requeridos, bien embaladas, conservadas y transportadas.

Debido a que la tuberculosis pulmonar es más frecuente que la extra pulmonar, el esputo es la muestra para análisis por TB que más se recibe en el laboratorio, sin

embargo, como esta enfermedad puede alcanzar cualquier parte del cuerpo, también es común recibir muestras de lavado gástrico, lavado o cepillado bronquial, hisopado laríngeo, orina, sangre, biopsias, líquidos cefalorraquídeos, pleurales, ascíticos, articulares, peritoneales, pericárdicos, entre otros.

## **Todas las muestras de lesiones extra pulmonares se deben cultivar**

### **4.1 Cantidad de muestras y momento para su recolección**

#### ***Búsqueda pasiva***

##### **Tres muestras:**

1. La primera muestra debe ser tomada en el momento de la consulta (**muestra inmediata**).
2. La segunda muestra la debe recolectar el paciente al día siguiente, por la mañana al despertar (**muestra matinal**).
3. La tercera muestra, puede ser tomada en el centro de salud, cuando el paciente llega a entregar la segunda. También puede ser recolectada por el paciente al despertar en su casa (**muestra matinal**).

En casos especiales, por largas distancias u otras particularidades, el personal de salud puede solicitar solamente dos muestras de esputo con diferencia de al menos media hora entre una y otra.

#### ***Búsqueda activa***

##### **Dos muestras:**

1. La primera muestra debe ser tomada en el momento del contacto con el paciente (**muestra inmediata**).
2. La segunda muestra debe recolectarse al menos 30 minutos después de la primera.

#### ***Controles de tratamiento***

##### **Una muestra por control (tres en total):**

1. Al término de la fase inicial –dos a tres meses- (**una muestra matinal**).
2. Al final del quinto mes de tratamiento (**una muestra matinal**) para controlar la evolución del paciente y detectar un posible fracaso del tratamiento.
3. Al final del tratamiento (**una muestra matinal**), para confirmar curación.

## 4.2 Esputo

### *Envase, características*

Boca ancha: de aproximadamente 5 cm de diámetro.

Capacidad: 30 a 50 ml

Cierre hermético: con tapa de rosca

Material: plástico transparente y resistente a roturas

Desechable.

Estéril.

Un envase de boca ancha de 30 a 50 ml facilita que el paciente coloque toda la expectoración dentro del envase, reduciendo la posibilidad de pérdidas de muestra y también facilita el trabajo del laboratorio, principalmente en la evaluación de la calidad de la muestra, la ubicación de la partícula útil y la realización del extendido.

El cierre hermético evita derrames durante el transporte y la producción de aerosoles cuando se abre en el laboratorio. *Las tapas a presión no se deben utilizar pues conllevan mayor riesgo de formación de aerosoles y salpicaduras en el momento de ser retiradas.*

El material plástico transparente permite observar la calidad de la muestra.

No se deben 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.

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. Con la primera muestra se puede detectar aproximadamente el 80% de los casos positivos, la segunda agrega un 15% y la tercera un 5% más.

La obtención de la muestra en el momento de la consulta inicial asegura que se pueda realizar al menos una baciloscopia del SR o sintomático. 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 las otras muestras en el caso de las búsquedas pasivas.

### *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 recolectarla y cómo manipularla hasta entregarla en el laboratorio.

### *Pasos a seguir para la recolección del esputo*

1. *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 baciloscopía.

2. *El personal de salud debe entregar al SR el envase para la recolección del esputo con su nombre, número de identificación, fecha y número de muestra (1, 2 o 3) y explicarle cómo usarlo. 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 marcador de tinta indeleble y además, antes de recoger la muestra.*
3. *Solicitarle al SR una buena muestra de esputo utilizando la palabra que lo identifica en cada lugar (flema, “gallo”, “gargajo”, “cuecha”, del fondo del pecho, entre otros), teniendo cuidado de no ofender e 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 toalla de papel y lávese las manos con agua y jabón

### **Calidad de la muestra de esputo**

Una buena muestra tiene de 3 a 5ml, es generalmente espesa y mucosa. Puede ser fluida y con partículas de material purulento. El color es variable (blanco, amarillento y hasta verdoso). A veces son sanguinolentas.

**Figura 1.** Tipos de muestra de esputo.



Mucosa purulenta



Sanguinolenta



Mucosa



Salivosa

**La muestra de esputo mucosa purulenta, proveniente del árbol bronquial, es la que asegura mayor probabilidad de que se puedan observar bacilos.**

Las secreciones nasales, faríngeas o la saliva no son buenas muestras para investigar tuberculosis, aunque **siempre se deben analizar**, porque 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.

Para no entorpecer la recolección de las muestras de esputo, asegúrese de que **por ningún motivo sean rechazadas en la ventanilla del laboratorio**. ***Una vez que la muestra llega al área de procesamiento, se podrán aplicar los criterios de rechazo que se indican más adelante en este mismo apartado.***

La recepción de las muestras de esputo en ventanilla **no debe limitarse** a un horario establecido, éstas deben aceptarse **en cualquier momento dentro de la jornada laboral**.

No descarte ningún residuo de muestras hasta que el proceso de análisis y reporte haya finalizado satisfactoriamente.

Si fuera necesario guardar **muestras procesadas**, manténgalas en refrigeración a 4°C hasta por un máximo de 10 días.

El uso de una cantidad insuficiente de muestra para la preparación de frotis o cultivos es fuente de falsos negativos.

Para procesar cualquier tipo de muestra, deben cumplirse siempre las buenas prácticas de laboratorio y bioseguridad que aparecen en el apartado 12 de este manual.

Debido a que tenemos en Costa Rica lugares de muy difícil acceso, se pueden procesar muestras tomadas como máximo con siete días de antelación siempre y cuando se hayan mantenido en refrigeración (4°C) o en su defecto, se garantice que han sido conservadas en lugar fresco y protegidas de la luz solar.

### ***Criterios para rechazar una muestra***

- Muestras en hisopados, a excepción del hisopado faríngeo.
- Muestras en recipientes rotos, encerados, destapados o con derrames.
- Muestras congeladas.
- Muestras que han permanecido a temperatura ambiente más de 3 días desde su recolección.

**Cuando la muestra procede de una búsqueda activa, nunca debe ser rechazada.**

Proceda así:

- Indique en la hoja de solicitud de análisis la razón del rechazo y envíe una copia al archivo para que sea incluida en el expediente del paciente.
- Comunique al responsable del programa que se requiere una nueva muestra. **Documente dicha comunicación.**

## ***Transporte y conservación***

Si las muestras de esputo no van a ser procesadas el mismo 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 conservarse 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 (no se van a cultivar)** 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.

Cuando el centro de salud no cuenta con laboratorio, su personal debe conocer a qué laboratorio debe enviar las muestras, cuándo 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.

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 des-contaminables 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 debidamente llena y con aclaración sobre si es muestra para diagnóstico (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup>) 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.

### ***Muestras solicitadas a pacientes con fácil acceso al centro de salud***

Idealmente, el esputo debe ser entregado en menos de dos horas y transportado a temperatura ambiente.



Si la muestra se solicita para realizar cultivo, una vez recibida dicha muestra debe refrigerarse. Puede mantenerse en refrigeración por un **máximo de 5 días**.

*Muestras solicitadas a paciente con difícil acceso al centro de salud y muestras obtenidas a partir de una búsqueda activa*

Se le deben solicitar al paciente un mínimo de dos muestras de esputo. El personal de salud encargado las trasladará en un recipiente refrigerado al centro de salud, en donde se mantendrán en refrigeración hasta ser procesadas. Las muestras tomadas en lugares de muy difícil acceso, se pueden procesar como máximo siete días después, siempre y cuando se mantengan en refrigeración (4°C) o en su defecto, se garantice que han sido conservadas en lugar fresco y protegidas de la luz solar.

**Tabla 1: Condiciones para el mantenimiento y transporte de muestras de esputo.**

| <b>Situación</b>   | <b>Condición ambiental de mantenimiento o transporte</b>  | <b>Tiempo crítico</b>                                       |
|--|---|---|
| <b>Conservación de muestras ya procesadas</b>                                | 4°C   | Máximo 10 días  |
| <b>Muestras solicitadas a pacientes con fácil acceso a centro de salud</b>   | Temperatura ambiente  | Esputo entregado en menos de dos horas desde su recolección |
| <b>Muestra para cultivo</b>  | 4°C   | Máximo 5 días   |
| <b>Muestras solicitadas a pacientes con difícil acceso a centro de salud</b> | 4°C o en su defecto, se garantice que han sido conservadas en lugar fresco y protegidas de la luz solar | Máximo 7 días   |

### 4.3 Otras muestras

La baciloscopia de los líquidos con volumen mayor a 1 ml debe ser realizada luego de centrifugarlos 15 minutos a 3000xg, y la de tejidos después de disgregar el material. Por esta razón es altamente recomendable que la baciloscopia de estas muestras sea realizada en el mismo laboratorio que cultivará la muestra. En caso de disponer de otras metodologías diagnósticas, proceder conforme lo indica el fabricante y con el visto bueno del CNRM.

**Tabla 2:** Cantidad, volumen y encargado de la toma según tipo de muestra para investigación por BK.

| Muestra          | Cantidad de muestras   | Volumen por muestra   | Encargado de la toma de la muestra                   |
|------------------|--|---|--|
| Lavado gástrico  | 3 en días sucesivos a nivel hospitalario   | 10 ml (3 ml en niños)   | Personal de enfermería o médico                      |
|                  | Se realiza de preferencia en niños y, en adultos mayores o personas con dificultades para expectorar. Envío inmediato al laboratorio en envase especial (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> –un milígramo por cada mililitro de jugo gástrico-). Procese de inmediato. <b>Solo el cultivo se considera diagnóstico.</b> <u>No se hace frotis directo</u> , solo del sedimento luego de la centrifugación. Rechace muestras sanguinolentas.  |   |  |
| Muestra          | Cantidad de muestras   | Volumen por muestra   | Encargado de la toma de la muestra                   |
| Lavado bronquial | 1 (una)  | Al menos 5ml  | Reservada a médico especialista                      |
|                  | Esterilizar rigurosamente el fibrobroncoscopio con glutaraldehído al 2% activado con una sustancia bicarbonatada, o según las indicaciones del proveedor. Después de la esterilización, lavar el fibrobroncoscopio enérgicamente para desprender bacilos que puedan haber quedado adheridos. Envío inmediato al Laboratorio para <u>frotis y cultivo</u> . 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 baciloscopia.<br>Después de un lavado bronquial generalmente se produce mucha expectoración en las 24hrs siguientes, por lo que debe instruirse al paciente para que recoja la expectoración. Aproveche esta muestra y procésela como un esputo. |   |  |
| Muestra          | Cantidad de muestras   | Volumen por muestra   | Encargado de la toma de la muestra                   |
| Orina            | Mínimo 3 y máximo 6 en días consecutivos   | No menos de 50ml del segundo chorro de primera micción de la mañana | Paciente solo o asistido por personal de enfermería. |
|                  | Envase: de 300-500 ml, limpio y de boca suficientemente ancha para posibilitar la recolección directa. Procesar esta muestra de inmediato, pero en caso de que esto no sea posible, refrigerarla a 4°C por no más de 12 horas. Si se debe transportar hasta otro laboratorio, se recomienda enviar el sedimento de toda la orina centrifugada durante 15 minutos a 3.000 g. Para disminuir factores inhibitorios presentes en la orina, puede adicionar tres gotas de CaCO <sub>3</sub> al 10% por cada 10ml de orina. Rechazar muestras de orina que no sean de la primera micción de la mañana y las de 24horas. <u>No se debe hacer frotis directo ni posterior a la descontaminación.</u> Únicamente el cultivo es diagnóstico.  |   |  |

**Tabla 2:** Cantidad, volumen y encargado de la toma según tipo de muestra para investigación por BK. *Continuación.*

| Muestra   | Cantidad de muestras   | Volumen por muestra   | Encargado de la toma de la muestra                                    |
|---|--|---|---|
| <b>Sangre</b>   | 2 en días consecutivos   | 10ml de sangre venosa para el adulto, 3-5ml en niños y 2ml en menores de 3 meses. | Puede ser tomada por personal de enfermería, de laboratorio o médico. |
|   | Utilice heparina como anticoagulante. <u>No usar EDTA.</u> 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. <u>Con el sedimento se debe realizar el frotis y la siembra del cultivo.</u> |   |   |
| Muestra   | Cantidad de muestras   | Volumen por muestra   | Encargado de la toma de la muestra                                    |
| <b>Líquido cefalorraquídeo</b>                                    | Todas las necesarias; cuanto mayor es la cantidad de muestras procesadas, mayor es la posibilidad de hallazgo de bacilos.  | No menos de 2ml.  | Reservada a personal médico   |
|   | Envase estéril de 10-15 ml de capacidad y con tapa de rosca de cierre hermético. Sin anticoagulantes ni preservantes. Procesar el material inmediatamente o conservado a 4° C por no más de 12 horas. <u>Con el sedimento se debe realizar el frotis y la siembra del cultivo.</u>   |   |   |
| Muestra   | Cantidad de muestras   | Volumen por muestra   | Encargado de la toma de la muestra                                    |
| <b>Líquidos pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros</b> | Todas las que el médico considere conveniente  | 5ml mínimo  | Personal médico   |
|   | Las muestras deben recogerse en tubos estériles heparinizados y sin preservantes. 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 para investigación de adenosina desaminasa (ADA) u otra técnica alternativa, se debe aprovechar la oportunidad de investigar por baciloscopia y cultivo el precipitado de la muestra.    |   |   |
| Muestra   | Cantidad de muestras   | Volumen por muestra   | Encargado de la toma de la muestra                                    |
| <b>Pus</b>  | 1 (una)  | La máxima cantidad posible  | Puede ser tomada por personal de enfermería, de laboratorio o médico. |
|   | 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. La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio que hace el cultivo o ser conservado refrigerado y protegido de la luz hasta su envío  |   |   |

**Tabla 2:** Cantidad, volumen y encargado de la toma según tipo de muestra para investigación por BK. *Continuación.*

| Muestra         | Cantidad de muestras  | Volumen por muestra | Encargado de la toma de la muestra |
|-----------------|---|---------------------|------------------------------------|
|                 | Las que se considere convenientes   | No aplica           | Personal médico                    |
| <b>Biopsias</b> | 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. Conservantes: uno o dos mililitros de solución fisiológica o agua destilada estéril para evitar la desecación. <b>No agregar formol</b> porque es letal para el bacilo, la porción de la muestra reservada para el estudio histopatológico debe ser separada. <b>No se aceptan muestras parafinadas. El material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio para su cultivo</b> o ser conservado refrigerado y protegido de la luz hasta su envío. |                     |                                    |

La baciloscopia de los líquidos con volumen mayor a 1 ml debe ser realizada luego de centrifugarlos 15 minutos a 3000xg, y la de tejidos después de disgregar el material. Por esta razón es altamente recomendable que la baciloscopia de estas muestras sea realizada en el mismo laboratorio que cultivará la muestra. En caso de disponer de otras metodologías diagnósticas, proceder conforme lo indica el fabricante y con el visto bueno del CNRM.

## 5. Baciloscopia

Para que la baciloscopia sea positiva es preciso que la muestra tenga más de 5.000 bacilos por mililitro. 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.

A pesar de que se cuenta con metodologías mucho más sensibles que ésta, la baciloscopia sigue siendo la técnica de elección para el diagnóstico rápido y el control del tratamiento de la tuberculosis pulmonar del adulto ya que es simple, económica y eficiente. Es la herramienta fundamental de un programa de control de la tuberculosis.

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.

## 5.1 Control de calidad interno de baciloscopías

Es responsabilidad de cada laboratorio que realiza baciloscopías. 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 baciloscopía
- ✓ El rendimiento de la baciloscopía 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.

Es necesario, como parte del control de calidad interno, llevar control de tinción por registro (ver Anexo 13). Éste, como mínimo una vez al mes y de manera que pueda evaluarse al personal que realiza la tinción, en el cumplimiento de los procedimientos.

## 5.2 Preparación y fijación del extendido

Si cumple las medidas de bioseguridad recomendadas en esta norma, el riesgo para el personal de laboratorio de adquirir la tuberculosis es mucho menor que el de quienes están cerca de 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:

1. Lavarse las manos
2. Colocarse el EPP (la gabacha, el respirador N95 y guantes) y de ser posible, lentes de seguridad.
3. Antes de ingresar al área de trabajo, asegurarse de que la luz ultravioleta se encuentra apagada.
4. Asegurarse de contar con lo necesario para realizar el extendido:
  - Mechero para la mesa de trabajo o esterilizador eléctrico de asas bacteriológicas para usar en CBS
  - Aplicadores
  - Soporte para los extendidos
  - Lápiz de grafito para marcar láminas portaobjetos
  - Láminas portaobjetos nuevas, previamente sumergidas en alcohol y secadas al aire.

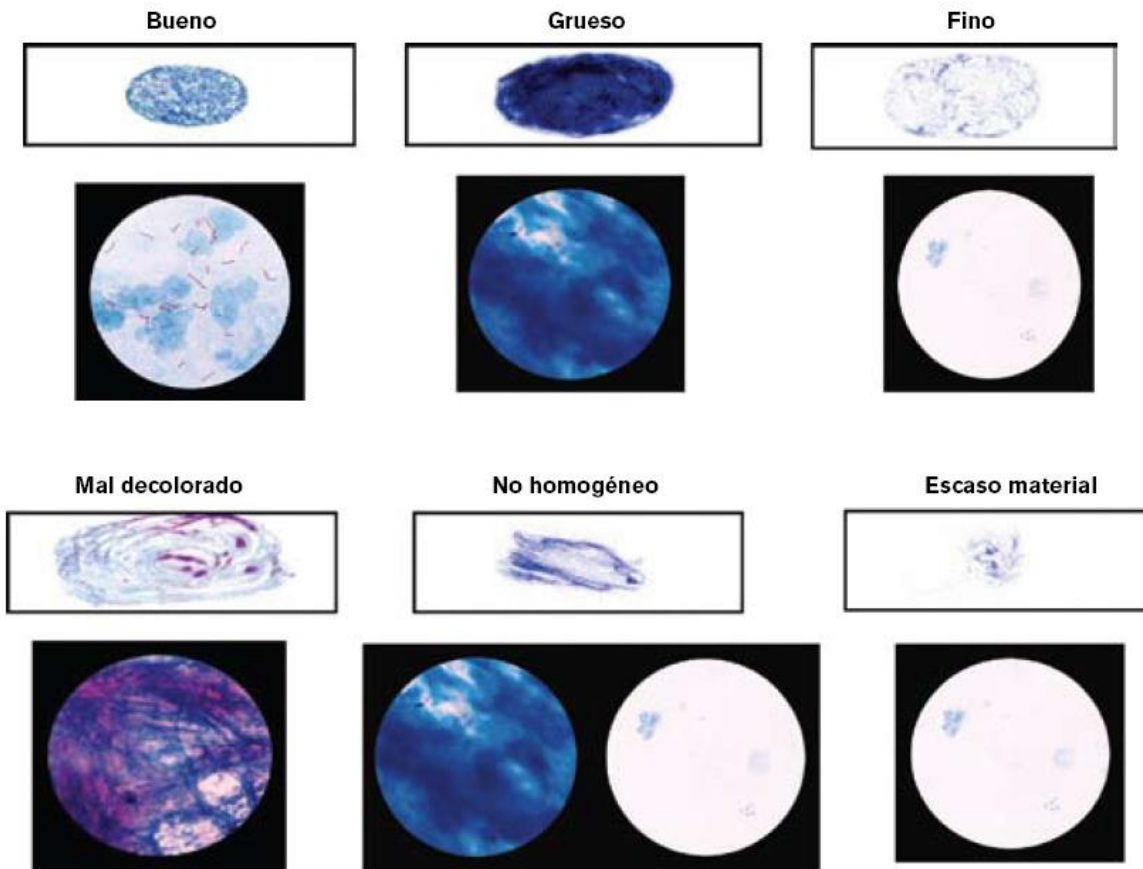
5. Colocar en la mesa de trabajo, que debe ser de superficie lisa, una bandeja o papel embebido en hipoclorito de sodio al 1%
6. Ubicar al lado de la mesa, el recipiente con tapa para descartar el material. Trabajar cada vez con no más de 12 envases con muestras.
7. Ordenar las muestras según su número.
8. Si las muestras estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases durante 20 minutos antes de comenzar a abrirlos.
9. Para cada muestra, rotular una lámina portaobjetos, siempre en el mismo borde. Debe ser el mismo número asignado en el registro del laboratorio, en el formulario de la solicitud de examen y en las paredes del envase que contiene la muestra. No tocar con los dedos la parte del portaobjetos destinada al extendido.
10. Colocar las muestras a la izquierda del analista, 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.
11. Usar una lámina para cada muestra. No colocar extendidos de más de una muestra en una lámina.
12. 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 personal del laboratorio de posibles formaciones de aerosoles al abrir el frasco.
13. Destapar con cuidado el envase.
14. Partir un aplicador en dos, tratando de que las puntas queden ásperas.
15. 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 útil más densa o purulenta de la muestra de esputo.
16. Enrollarla en una de las dos partes del aplicador con la ayuda de la otra. Si la muestra contiene varias porciones mucosas purulentas, tratar de mezclarlas con movimientos muy suaves del palillo y luego tomar una porción de la mezcla. Si sólo hay partículas purulentas pequeñas, escoger tres o más y mezclarlas en el mismo portaobjetos para homogeneizarlas.
17. Colocar la(s) partícula(s) seleccionada(s) sobre el portaobjetos y extenderla(s) con el aplicador con movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla(s) 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 analista se contamine al manipularla.
18. Verificar que el extendido tenga *grosor homogéneo y adecuado (ver Figura 2)*. 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

**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 baciloscopía directa de esputo.**

- 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.
19. Dejar el extendido en un soporte ubicado al costado de la mesa 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.
  20. 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.
  21. 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.
  22. Continuar de la misma manera con cada una de las muestras siguientes.
  23. Conservar las muestras hasta terminar las lecturas de la baciloscopía y verificar que no es necesario realizar nuevos extendidos o enviarlas para cultivo.
  24. Limpiar la superficie de trabajo con una toalla de papel o algodón empapado en hipoclorito de sodio al 1% para desinfectar o alcohol 70% en superficies metálicas.
  25. 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.
  26. Esperar a que las láminas se hayan secado al aire.
  27. Tomar un extendido a la vez, 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.
  28. Colocar cada lámina fijada en un soporte, puede ser el soporte que se va a utilizar para la coloración.
  29. Si para teñir las láminas las tiene que trasladar a otro lugar, se debe hacer dentro de una caja porta láminas, con cierre seguro. De ser posible, antes de trasladarlas, irradiar las láminas con una LUV durante media hora para garantizar que los bacilos mueran.

**Los extendidos deben ser teñidos lo más pronto posible, ya que algunos bacilos pueden permanecer vivos después de fijados con calor hasta que incorporan la fucsina. Si fuese necesario trasladarlos para tinción, se recomienda irradiar los extendidos con una LUV micobactericida durante media hora.**

**Figura 2.** Grosor, distribución y tinción del extendido para baciloscopia.



**Figura 3.** Actividades para preparación del frotis y tinción de Ziehl Neelsen.





## 5.3 Tinción

### 5.3.1 El Ziehl Neelsen

Si aplica las medidas de bioseguridad recomendadas en esta norma, el riesgo para el personal de laboratorio es mínimo.

- Filtrar la cantidad de fucsina y azul de metileno necesarias para las tinciones a realizar en la jornada. Si el número de baciloscopías a colorear es pequeño, se pueden filtrar los colorantes directamente cuando se los deposita sobre el extendido a través de un pequeño embudo con papel de filtro.
- Colocar dos varillas de vidrio o metal pintado, en forma paralela, a una distancia de aproximadamente cinco centímetros entre una y otra, sobre un soporte dentro de la pila/pileta de coloración.
- 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.
- Teñir en grupos no mayores a seis láminas por turno.
- Cubrir **totalmente** la superficie de la lámina 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 de tamaño pequeño y humedecido en alcohol o una lámpara pequeña de alcohol (no inclinarla nunca), calentar suavemente por debajo de los extendidos y uno por uno, con movimientos de vaivén, hasta que observe que se desprenden los primeros vapores blanquecinos. No calentar con mechero bunsen.

**En caso de derrame del colorante, reponer la fucsina. No dejar secar el preparado.**

- En el término de 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 analista. 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.

- Inclinarse el portaobjetos para eliminar el exceso de agua y así evitar diluir los reactivos que se utilizarán a continuación.
- Cubrir la **totalidad** de la superficie de la lámina del lado en donde está el extendido con solución decolorante y dejar actuar dos minutos.
- Enjuagar con abundante agua a baja presión y eliminar el exceso de agua inclinando el portaobjetos.
- Cubrir **toda** la superficie de la lámina donde está el extendido con solución de azul de metileno.
- Dejar actuar durante un minuto y enjuagar las láminas en ambas caras con agua a baja presión y limpiar la parte inferior con un algodón si ha quedado con residuos de tinción.
- 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.

### 5.3.2 Tinción fluorescente

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.

Cuando se realiza la tinción de los extendidos con los fluorocromos auramina-O, auramina-rodamina, o auramina, los BAAR se ven como bastoncillos amarillos fluorescentes. Para observarlos se utilizan microscopios con fuente de iluminación y filtros especiales.

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 baciloscopías positivas** volviendo a colorear el mismo frotis teñido con fluorocromo por la técnica de **Ziehl Neelsen** y reportar semi cuantitativamente. 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 láminas.
- Cubrir los extendidos con solución fluorescente 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 más 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 protegidos 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.

**Si utiliza otro fluorocromo o procedimiento de tinción, seguir estrictamente las indicaciones del fabricante y correr siempre controles de calidad positivos y negativos**

#### 5.4 Observación microscópica

La observación microscópica debe cumplir dos objetivos:

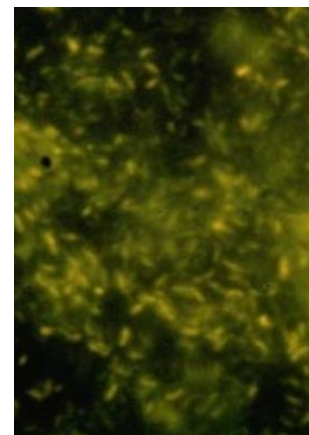
1. Determinar la presencia de bacilos (reporte cualitativo), en tinciones de Ziehl Neelsen y fluorocromos.
2. Cuantificar los BAAR en el caso de la tinción de Ziehl Neelsen.

#### *Características morfológicas del bacilo de la tuberculosis*



Los bacilos ácido resistentes tienen entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  de largo. Con la coloración de Ziehl Neelsen se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, rosado fucsia o rosado neón, 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 las 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 cocobacilos.

Otros microorganismos pueden presentar distintos grados de ácido resistencia, como *Rhodococcus sp*, *Nocardia sp*, *Legionella sp*. Estos se observan como cocos, pleomórficos, filamentos que a veces están cortados. También pueden aparecer como ácido resistentes los quistes de *Cryptosporidium sp* e *Isospora sp*, que se observan como esferas de gran tamaño si se las compara con las bacterias.

De todas formas, es poco frecuente encontrar más de 10 microorganismos alcohol-ácido-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.

**Cuando el baciloscopista observa alguno que no tiene forma de bastón debe consultar al supervisor. Si la duda persiste, comunicarse con el CNRM**

#### 5.4.1 Lectura de extendidos coloreados por Ziehl Neelsen

- Ubicar cerca del microscopio todos los elementos necesarios:
  - aceite de inmersión
  - toallas o trozos de papel suave (papel seda)
  - el registro del Laboratorio
  - un bolígrafo
  - una caja para guardar portaobjetos
  - un frasco con xilol o con etanol al 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.
- 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 campos. Por ejemplo, de izquierda a derecha.
- Observar la calidad del extendido y de la coloración. Si no fuesen buenas, repetir nuevamente la baciloscopia de esa muestra.
- Contar el número de campos que ha leído y el número de BAAR que ha identificado. Se puede utilizar una cuadrícula de 10 por 10, que representan

los 100 campos microscópicos, como ayuda para registrar la cuenta. En cada cuadrado o rectángulo, anotar el número de BAAR que se observa. Si no observa BAAR consignar 0 (cero), ver figura 4.

**Figura 4.** Ejemplo de cuadrícula 10 por 10, para lectura y registro de baciloscopías.

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 3 | 0 | 0 | 4 |
| 1 | 1 | 2 |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |

- El número total de campos a examinar depende de si se encuentran bacilos y la cantidad encontrada.

**Tabla 3:** Número de campos microscópicos a examinar según la cantidad de BAAR encontrados.

| <i>Promedio de BAAR encontrados</i> | <i>Número mínimo de campos microscópicos útiles a examinar</i> |
|-------------------------------------|--|
| 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.

**Utilice siempre el tornillo micrométrico del microscopio.**

**Considere campo microscópico útil todo aquel en el que se observen elementos como leucocitos, mucus, células ciliadas, entre otras células. Los campos que no contengan algunos de estos elementos no deben contabilizarse en la lectura.**

- Un microscopista experimentado completa la lectura de 100 campos en aproximadamente **cinco minutos**.
- Al finalizar la lectura, girar el revólver 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 papel absorbente. Esto evita la transferencia de material al siguiente frotis que se va a leer.

**En caso de que por alguna razón el microscopista analizó más de 100 campos, el procedimiento a seguir frente al hallazgo de menos de 1 BAAR en 100 campos observados es el siguiente:**

- Solicitar al supervisor que observe el hallazgo para asegurarse de que se trata de un BAAR.
- De confirmarse que es un BAAR, ampliar la lectura 100 campos más.
- 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 reportarse con el número exacto de bacilos observados, consignando en el Libro de Registro el hallazgo y solicitar una nueva muestra o serie de esputos.

#### 5.4.2 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 y en un período no mayor de 30 minutos después de realizada, porque con algunas técnicas la fluorescencia se desvanece rápidamente; si no es posible leerlos inmediatamente deben guardarse en un lugar oscuro, de preferencia en el refrigerador, durante el lapso máximo que el fabricante indique o en su defecto, el propio laboratorio tenga debidamente documentado.
- 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

## 5.5 Informe de Resultados

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

**Tabla 4:** Escala para el informe de los resultados de extendidos examinados por Ziehl Neelsen.

| Resultado del examen microscópico                                 | Informe   |
|---|---|
| No se encontraron BAAR en los 100 campos microscópicos            | <b>No se observaron bacilos alcohol ácido resistentes</b> |
| Se encontraron entre 1 y 9 BAAR en 100 campos microscópicos       | <b>Número exacto de bacilos en 100 campos</b>             |
| Se observaron entre 10 y 99 BAAR en 100 campos microscópicos      | <b>Positivo (+)</b>                                       |
| Se observaron de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos microscópicos | <b>Positivo (++)</b>                                      |
| Se observaron más de 10 BAAR por campo en 20 campos microscópicos | <b>Positivo (+++)</b>                                     |

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

1. Registrar inmediatamente el resultado de la lectura en el Registro del Laboratorio. Marcar los resultados positivos, para identificarlos rápidamente.
2. Escribir el resultado en el formulario adoptado para el informe por el PNCTB.
3. Verificar que el informe contenga todo lo que requiere, incluyendo:
  - a. El nombre y número de cédula, pasaporte u otra identificación del paciente
  - b. El número de la muestra
  - c. El método de tinción utilizado
  - d. El resultado del examen microscópico expresado según la escala estandarizada
  - e. La fecha

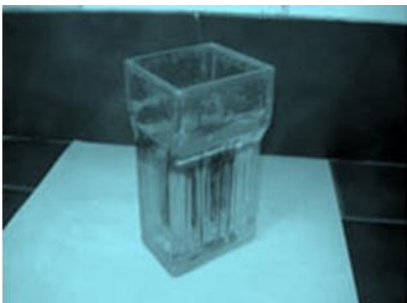


- f. Toda observación que considere relevante, por ejemplo la calidad de la muestra si es inadecuada
  - g. Nombre y firma del responsable del examen microscópico.
4. En caso de ser positivo, enviar el resultado de inmediato al médico tratante y al responsable del PICTB y en caso negativo, antes de 72 horas.
  5. El tiempo que demore 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 que se pierda un enfermo.

Es necesario el mayor esfuerzo posible para que los resultados positivos de la baciloscopía sean reportados de inmediato y los negativos dentro de 72 horas siguientes a la recepción de la muestra en el laboratorio.

## 5.6 Conservación de 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 portaobjetos, con xilol o similar o alcohol al 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 rótulo el resultado de cada una.

Conservarlas en lugar seco y fresco.

Enviarlas al CNRM en la proporción que éste indique y descartar las demás después de un mes. Para este envío llenar el formulario de solicitud de confirmación diagnóstica disponible en el sitio Web de INCIENSA, dirección <http://www.Inciensa.sa.cr/>, seleccionar allí “formularios” y luego [Solicitud de confirmación diagnóstica](#) (USEC-R02), las instrucciones para el llenado de este formulario están en [Solicitud de confirmación diagnóstica de baciloscopías, instrucciones de llenado](#), (USEC-R03).

Eventualmente, se puede recibir del laboratorio de referencia un panel de láminas para colorear, leer e informar el resultado.

Este panel debe ser introducido en el procedimiento de rutina, sin realizar procedimientos especiales para este control.

## 5.7 Operacional

De acuerdo a las normas establecidas, se deben enviar al CNRM, copias digitales de los registros de resultados de la baciloscopía, o el consolidado de resultados mensual o trimestral.

Una vez analizados, el CNRM enviará las observaciones y las recomendaciones sugeridas las cuales deberán ser analizadas y puestas en práctica.

## 6. Cultivo

Para el estudio de *Mycobacterium tuberculosis* se utilizan muestras que pueden estar contaminadas, entre éstas: esputo, hisopado laríngeo, lavados bronquial y gástrico, orina, piel, heces, biopsias de lesiones abiertas y tejido pos mortem. Estas muestras deben ser sometidas a un proceso de descontaminación para mejorar la recuperación de micobacterias viables.

Las muestras que por lo general no se encuentran contaminadas son: sangre, médula ósea, fluidos corporales (pleural, ascítico), líquido cefalorraquídeo, tejidos y biopsias de órganos internos tomados con métodos quirúrgicos. En estos casos y mientras se garantice una técnica de muestreo aséptica, se puede prescindir de la descontaminación.

Es posible alcanzar un alto porcentaje de recuperación de micobacterias presentes en especímenes clínicos en tanto los procedimientos de descontaminación y digestión se lleven a cabo correctamente.

La digestión contribuye a la liberación de las micobacterias del material en el que se hayan contenidas, mientras que la descontaminación tiene como fin eliminar la competencia de microorganismos de más rápido crecimiento que las micobacterias tuberculosas.

El método de elección para la descontaminación de las muestras es el de Petroff.

### 6.1 Descontaminación: Petroff

El hidróxido de sodio se emplea en el método de Petroff como agente descontaminante y como digestor. Su mayor efectividad mucolítica se alcanza a una concentración del 4%, sin embargo, esta concentración es tóxica también para las micobacterias, de ahí que este paso sea crucial para la recuperación eficaz del agente etiológico.

Para prevenir la contaminación por micobacterias ambientales, use en todo momento agua destilada estéril.

Trabaje las muestras siempre en el mismo orden a fin de detectar más fácilmente una contaminación de muestra a muestra.

Para llevar a cabo este procedimiento se debe disponer de tubos cónicos plásticos de 50ml, con tapa de rosca, graduados y estériles. Se debe contar con una centrífuga contra aerosoles para minimizar el riesgo en materia de bioseguridad.

- Coloque la muestra en un tubo cónico graduado de 50ml.
- Adicione solución de NaOH 4% en cantidad igual al volumen de la muestra. En caso de que la contaminación de la muestra sea elevada, utilice solución NaOH 6% en lugar de NaOH 4%.
- Agite en un vortex por 15 segundos y deje reposar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Si no tiene vortex entonces agite en forma de 8, deje reposar y repita dos veces a intervalos de 5 a 10min.
- Diluya la mezcla con agua destilada estéril hasta la marca de 50ml.
- Ponga la tapa al tubo asegurándose que quede bien cerrado y entonces inviértalo varias veces para mezclar el contenido.
- Centrifugue el tubo a 2000xg durante 20 minutos.
- Utilizando un embudo de pistilo largo y grueso, descarte el sobrenadante dentro de un recipiente de boca ancha que contenga hipoclorito de sodio al 5% (apartado 8.1). No permita que la solución desinfectante entre en contacto con el tubo que contiene el sedimento de la muestra.
- Agregue al sedimento 1 gota de solución indicadora de fenolftaleína al 0,5%. El sedimento debe entonces tomar una coloración rosado fucsia.
- Adicione, gota a gota, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 15% hasta que desaparezca la tonalidad del sedimento y permanezca incoloro. Mientras se agrega cada gota agite constantemente.
- Si desea hacer un frotis, utilice un asa bacteriológica de 3mm de diámetro o el extremo de un aplicador estéril para tomar una porción del sedimento. Prepare con ella un frotis de 1x2 cm sobre un portaobjetos nuevo, limpio y sin ningún rayón, así como con un borde esmerilado para escribir con lápiz de grafito la identificación de la muestra.
- Suspenda de nuevo el resto del sedimento en 1 o 2ml de solución salina fisiológica estéril o en agua destilada estéril e inocule la suspensión en dos tubos de medio Löwenstein Jensen y uno de agar sangre cuando amerite controlar la calidad del proceso.
- Si no va a inocular el sedimento inmediatamente, consérvelo a 4°C por un plazo no mayor a 24hrs.

## 6.2 Control de calidad del proceso de digestión-descontaminación

Para determinar la calidad descontaminante de los reactivos que está utilizando y controlar el procedimiento:

- Inocule en agar sangre, 0,2ml del sedimento de al menos una de las muestras descontaminadas. Esto debe hacerse cada vez que procesa un grupo de muestras.
- Después de incubar a 37°C durante 24 a 48hrs, observe el número de colonias en el agar sangre.
- Se considera contaminada toda muestra con más de cinco colonias.
- Cuando haya procesado 25 muestras, calcule el porcentaje de muestras contaminadas (más de 5 colonias).

Interpretación de resultados de control de calidad del proceso de digestión y descontaminación.

- i. El porcentaje de muestras contaminadas debe estar entre el 3 y el 5%.
- ii. Valores inferiores al 3% significan que se hizo una digestión-descontaminación excesiva.
- iii. Valores superiores al 5% indican que se hizo una digestión-descontaminación incompleta.

### 6.3 Cultivo de las muestras

La *M. tuberculosis* es un aerobio estricto, de crecimiento muy lento y exigente en sus requerimientos nutricionales, por lo que necesita medios de cultivo especiales como el Löwenstein-Jensen.

Este medio de cultivo contiene huevo, glicerol, asparagina y citrato de magnesio. La temperatura de crecimiento óptimo es entre 35 y 37°C, a un pH de 6,7 a 6,9.

El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico para detectar la presencia de micobacterias vivas. Con el cultivo es posible detectar entre 10 y 100 bacilos viables, mientras que para que una baciloscopía resulte positiva, se requieren de al menos 5.000 bacilos por mililitro.

El cultivo permite entonces detectar casos menos infecciosos ya que los altamente infecciosos se pueden detectar por microscopía.

Se cultivarán:

- Muestras de pacientes BK negativos altamente sospechosos.
- Pacientes con VIH/Sida
- Pacientes pediátricos
- Recaídas
- Sospecha de fracaso
- Fracazos terapéuticos
- Tb extra pulmonar
- MDR diagnosticados (se realiza frotis y cultivo mensuales hasta que haya conversión –dos frotis y dos cultivos negativos separados por treinta días-)
- Conversión MDR, frotis mensual y cultivo cada tres meses.

**En caso de disponer de pruebas moleculares, proceder conforme al flujograma que corresponda, ver en los anexos.**

#### *Inoculación*

Coloque sobre el área de trabajo dos gradillas. En una ponga los tubos con las muestras ya neutralizadas (el número de muestra debe estar claramente visible en

cada tubo) y en la otra coloque dos tubos de cultivo por muestra debidamente identificados. Si alguno de los tubos con medio contiene agua de condensación, elimínela antes de sembrar.

Con una pipeta Pasteur estéril, tome aproximadamente 1,0ml de producto neutralizado y siembre 0,2ml en cada uno de los dos tubos de medio de cultivo, dejando escurrir el inoculado sobre la superficie inclinada del medio y sin tocarla con la pipeta.

Una vez sembradas las muestras, distribuya el inoculado en toda la superficie del medio, rotando e inclinando. Deje floja la tapa de cada tubo para que se evapore la parte líquida de la siembra.

Ponga los tubos sobre una bandeja de fondo inclinado y colóquela en la incubadora entre 35 y 37°C.

Los tubos pueden mantenerse en posición inclinada (en cajas o bandejas con fondo inclinado) hasta el término del período de observación. Si esto no es posible, se pueden mantener dentro de la incubadora en posición vertical, lo que también permite economía de espacio.

Controle diariamente la temperatura de las incubadoras y regístrelas en los formularios correspondientes.

Procure abrir las incubadoras lo menos posible durante la jornada laboral para evitar fluctuaciones de temperatura.

Una interrupción del fluido eléctrico por pocas horas no afecta el crecimiento de los microorganismos tuberculosos, siempre y cuando, no se abra la incubadora en ese lapso.

No inocule muestras en medios de Löwenstein Jensen que hayan permanecido refrigerados a 4°C por más de 4 meses.

#### 6.4 Revisión periódica de los tubos



Las colonias típicas de *M. tuberculosis* que se desarrollan en la superficie del medio, son de color crema, de aspecto rugoso, opacas, en forma de coliflor y el área de medio en que



crecen no cambia de color. La primera revisión debe hacerse a las 48hrs para descartar contaminación y luego, con una periodicidad semanal, que debe mantenerse por un máximo de 60 días, mientras el cultivo permanezca negativo.

### **Revisión a las 48 horas:**

El desarrollo de colonias durante las primeras 48 hrs de incubación es un indicativo de contaminación por flora microbiana secundaria.

En algunas ocasiones el medio puede licuarse por la acción de microorganismos proteolíticos; también puede cambiar su coloración normal verde, por un color blanco amarillento (tubo alcalinizado) o verde azulado oscuro (tubo acidificado). Este cambio en la coloración es debida a una inadecuada neutralización de la muestra. Cuando esto ocurra, deben descartarse los tubos y emplear la muestra de reserva para llevar a cabo nuevamente el procedimiento de descontaminación-neutralización.

### **Revisiones después de las 48 horas:**

Si se observa contaminación luego de las primeras 48hrs, esta no excluye la presencia de *M. tuberculosis*.

En esos casos proceder de la siguiente manera:

Si dispone de CBS, haga un frotis y tñea con Ziehl Neelsen. Si concluye que hay contaminación, descarte el tubo, repórtelo como contaminado y de ser necesario, solicite una nueva muestra.

En caso de no poder hacer esto, sea por no contar con una CBS o porque solamente dispone de ese tubo para diagnóstico, remítalo de inmediato al CNRM, detallando lo ocurrido en la misma boleta de diagnóstico.

En vista de que por lo general, se trabajan varias muestras de un mismo paciente, por duplicado, no debería haber inconvenientes por eliminar uno de estos tubos contaminados. Por lo tanto, solicite una nueva muestra solamente en caso de que se hayan eliminado tubos de cultivo críticos para llegar a una conclusión.

### **6.5 Reporte de cultivos sin crecimiento:**

Los cultivos negativos se reportarán hasta cumplidos los 60 días de incubación.

### **6.6 Envío de cultivos al CNRM**

Envíe al CNRM todos los cultivos positivos de un paciente, menos uno, que debe conservar en su laboratorio por cualquier eventualidad.

Cuando se siembran por duplicado una, dos o tres muestras consecutivas de un paciente, deben enviarse todos los tubos positivos juntos para facilitar el proceso de identificación bacteriana. Los tubos deben, sin excepción, venir acompañados de la boleta de solicitud de diagnóstico (Solicitud de Diagnóstico USEC-R01), disponible en el sitio Web de INCIENSA, <http://www.Inciensa.sa.cr/> en "[Formularios](#)" y siguiendo las recomendaciones de embalaje que se indican en este manual.

También deben enviarse al CNRM los cultivos de pacientes a quienes no es posible tomar varias muestras en días consecutivos, tales como LCR, biopsias, pus de abscesos, entre otras, aunque presenten escaso crecimiento.

### No envíe al CNRM:

- Cultivos que no presenten un crecimiento concordante con el resto de los tubos. Por ejemplo, si tiene 5 tubos con crecimiento similar y uno con crecimiento diferente, no envíe este último.
- Aquellos cultivos en los que la contaminación haya cubierto la mayor parte de la superficie del medio.

### 6.7 Informe de resultados:



Transcribir el resultado consignado en el registro de laboratorio en el formulario adoptado por el Programa de Control de la Tuberculosis para el informe de cultivos.

Si la morfología de las colonias y, eventualmente, el examen microscópico de los bacilos desarrollados, permiten orientar la identificación, agregar según corresponda alguna de las siguientes observaciones:

- \* Con características compatibles con *Mycobacterium tuberculosis*
- Con características no compatibles con *Mycobacterium tuberculosis*, en identificación.

Informar los cultivos positivos y los totalmente contaminados en el mismo día en que son detectados. Cuando la lectura es visual, informar los cultivos negativos al finalizar la octava semana de incubación de los medios a base de huevos, y al finalizar la sexta semana los medios con agar o caldos. Seguir las instrucciones de los fabricantes en el caso de realizarse lectura automatizada de caldos

### **Lectura manual de medios con sensores del desarrollo**

El MGIT (Mycobacteria growth indicator tube) contiene caldo Middlebrook 7H9 y una base de pentahidrato de rutenio como indicador del desarrollo. Al hacer incidir luz UV, que puede ser emitida por una simple linterna o por el equipo provisto por el fabricante, el indicador fluoresce si algún microorganismo con metabolismo activo ha consumido O<sub>2</sub>. De manera que es posible detectar la presencia de una micobacteria en desarrollo antes de que el medio se ponga turbio.

El MB Redox es medio de Kirchner conteniendo una sal de tetrazolio (incolora) que puede ser reducida a formazán (rosa-rojo-violeta) cuando desarrolla un microorganismo y consume O<sub>2</sub>.

Siempre es necesario realizar un frotis con una muestra del medio para comprobar la presencia de BAAR. La observación de gruesos cordones de BAAR es indicativa de *M. tuberculosis*

### **Lectura automatizada de caldos**

Los equipos controlan automáticamente las botellas o tubos inoculados mientras los mantienen en incubación y emiten una señal cuando se detecta desarrollo. Es necesario seguir las indicaciones del fabricante de cada equipo

Siempre se requiere realizar un frotis con una muestra del medio para comprobar la presencia de BAAR. La observación de gruesos cordones de BAAR es indicativa de *M. tuberculosis*.

**Todas las muestras positivas deben ser enviadas al CNRM en Inciensa para identificación, pruebas de resistencia o confirmar el diagnóstico realizado por el laboratorio de la red.**



## Morfología de las colonias

Los medios sólidos evidencian el desarrollo de las micobacterias con cierto retardo con relación a los líquidos, pero en cuanto se detecta el desarrollo es posible diferenciar las colonias con características de *M. tuberculosis* con lo que, si se tiene experiencia, es posible orientar con mucho acierto si se ha aislado el bacilo de la tuberculosis.

Como se ha dicho, las colonias de *M. tuberculosis* son habitualmente rugosas, sin pigmentación, y secas si se ha absorbido bien en el medio la humedad propia de la muestra y las soluciones utilizadas para procesarla.

*M. kansasii* es una micobacteria ambiental que puede tener colonias rugosas con aspecto parecido a *M. tuberculosis* pero evidencian pigmentación amarilla cuando los cultivos jóvenes son expuestos a la luz, son foto-cromógenas. En caso de sospecha, para investigar esta propiedad proceder de la siguiente forma con un aislamiento recién desarrollado

- Proteger un tubo con el aislamiento con un papel opaco
- Exponer otro tubo a una lámpara de unos 40 watts a una distancia de 25cm durante una hora aproximadamente
- Incubar ambos tubos durante una noche a 37° C.
- Comparar la pigmentación de ambos tubos.

Cuando la micobacteria es foto-cromógena se verá el tubo protegido sin pigmentación o con pigmentación irregular, y el tubo expuesto a la luz francamente pigmentado, de color amarillo.

Las colonias de *M. bovis* y algunas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniacida son más planas y lisas. Cuando el medio de cultivo está muy húmedo, las colonias de cualquier micobacteria aparecen lisas. Entonces si las colonias desarrollan lentamente, no tienen pigmentación, son lisas, pequeñas o brillantes, se presenta la duda acerca de si lo que se ha aislado es una micobacteria ambiental.

Sin duda alguna es una micobacteria ambiental si se detectan colonias de BAAR con algún tipo de pigmentación (desde ligeramente amarilla hasta anaranjada fuerte) o con abundante desarrollo en medios a base de huevos durante la primera semana de incubación. Muy excepcionalmente *M. tuberculosis* puede aparecer tan precozmente si el inoculado es muy alto.

Si se sospecha el diagnóstico de micobacteriosis, la identificación debe ser proseguida con todos los aislamientos obtenidos con distintas muestras del paciente. Corresponde al CNRM, la identificación de micobacterias diferentes a las del complejo *M. tuberculosis*.

## 6.8 Precauciones para procesar cultivos positivos

Realizar todos los procesos que siguen en cabina de seguridad biológica.

- Después de procesar un cultivo y antes de tomar otro, descartar el asa, si es desechable, o esterilizarla, si es reutilizable.
- No utilizar llama para esterilizar asas dentro de la cabina. Esterilizar las asas de níquel-cromo dentro del tubo de un incinerador eléctrico
- Dejar enfriar el asa de níquel cromo después de esterilizarla y antes de reutilizarla para no dañar la viabilidad y metabolismo de las micobacterias que se están estudiando
- No abrir un tubo o frasco con cultivo positivo sin antes haber cerrado el anterior cuando se está identificando una serie de aislamientos
- No tocar con pipetas o frascos dispensadores de reactivos la boca o paredes de los tubos con cultivo.
- Descartarlos junto con el material potencialmente contaminado en el caso en que por accidente suceda.

### **Características microscópicas**

- Colocar con el asa estéril una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos identificado con el número del cultivo. Desechar el asa en un recipiente con hipoclorito de sodio al 1% si es plástica, o si no esterilizarla en incinerador y permitir que se enfríe
- Abrir la tapa del tubo con desarrollo, tomar con el asa escasa cantidad de material, cerrar el tubo
- Depositar el material sobre la gota de agua en el portaobjetos. Realizar el frotis extendiendo cuidadosamente el material
- Dejar secar, fijar y colorear el extendido siguiendo las indicaciones dadas en la primera parte de este Manual dedicado a la baciloscopía
- Observar en el microscopio, comprobar la presencia de BAAR, descartar la presencia de contaminantes no BAAR
- Si se observan BAAR, buscar agrupaciones de bacilos que se disponen en paralelo formando “cuerdas”, más o menos gruesas.
- Verificar si se observan bacilos muy largos, filamentos con o sin ramificación, ácido alcohol resistencia parcial.

La presencia de “cuerdas” es una indicación más de que lo que se ha aislado es *M. tuberculosis*. Las micobacterias ambientales se disponen en forma desagregada, más separadas entre sí, y suelen ser más cocoides.

Si en los frotis realizados del cultivo se observan BAAR y contaminantes, re-suspender varias asas del desarrollo obtenido en agua destilada estéril y proceder a descontaminarlo siguiendo los procedimientos descritos para tratar muestras. Puede ser necesario recurrir a la descontaminación utilizando ácidos en estos casos.

La presencia de filamentos y ácido alcohol resistencia parcial puede indicar la presencia de una micobacteria de rápido desarrollo u otro actinomicetal.

## 7. Pruebas moleculares

En las últimas décadas se han producido notables avances en el diagnóstico de la tuberculosis, con el desarrollo de herramientas de biología molecular que están contribuyendo a aminorar las limitaciones de las técnicas tradicionales, tanto para el diagnóstico de la tuberculosis, como para la realización de pruebas de susceptibilidad (Toro C. y Amor, A., 2010).

Actualmente, la identificación genotípica es una excelente alternativa para una precisa y rápida caracterización de las especies micobacterianas. Sus principales ventajas consisten en una aplicación universal sobre todos los aislamientos, posible detección rápida (directo de muestras o cultivos recientes), identificación de microorganismos de difícil cultivo, reconocimiento preliminar de nuevos taxones micobacterianos, gran seguridad biológica y una adecuada relación costo-beneficio en los laboratorios clínicos de segundo nivel o del CNRM. Sin embargo, aparte de las contaminaciones potenciales y limitaciones en su empleo directo sobre muestras clínicas, estas técnicas no pueden hoy día sustituir completamente a la metodología tradicional. Por otro lado, algunas, como la secuenciación, requieren una inversión inicial elevada. No obstante, en la actualidad existe una gran variedad de técnicas y con diferentes niveles de aplicación. Por ello, algunas de éstas pueden ser perfectamente implementadas en los laboratorios de rutina sin precisar una elevada inversión inicial, con un escaso mantenimiento y un rendimiento óptimo (Alcaide, F et al., 2005).

Tal es el caso del método GeneXpert MTB/RIF®, una prueba de amplificación de ácido nucleico totalmente automatizada que emplea un cartucho de uso único para diagnosticar la tuberculosis y la resistencia a la rifampicina. Este método purifica, concentra, amplifica (mediante una prueba de Reacción en Cadena de Polimerasa en tiempo real) e identifica secuencias de ácido nucleico específicas del genoma de *M. tuberculosis*; los resultados se obtienen en menos de 2 horas, a partir de muestras de esputo sin procesar, con empleo de tiempo mínimo por parte de personal técnico. Este sistema tiene el potencial de simplificar en gran medida las pruebas de amplificación de ácido nucleico eliminando la necesidad de contar con cuartos separados para la realización del PCR, (Helb et al 2010) y ha sido recomendado por la Organización Mundial de la Salud, su principal ventaja es que puede aplicarse directamente a la muestra reduciendo considerablemente el tiempo de diagnóstico, por lo que es de alta utilidad en los laboratorios de hospitales que procesan alto número de esputos. Tiene la limitante de que además de *M. tuberculosis* no es capaz de detectar otras especies de micobacterias y por otro lado sólo detecta resistencia a Rifampicina, dejando por fuera el resto de las drogas antituberculosas (Lawn y Nicol, 2011). Un limitante adicional es que hasta ahora ha sido estandarizado para el procesamiento de esputos y no de otro tipo de muestras.

La identificación de las especies de micobacterias más frecuentes en muestras clínicas por medio de la hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas es muy precisa y es aceptada en reemplazo de las pruebas bioquímicas. Aceleran mucho la identificación de la micobacterias ambientales potencialmente patógenas.

Uno de los sistemas basados en hibridación por sondas más utilizados para la identificación de micobacterias a nivel mundial es el GenoType®. Esta tecnología se basa en la realización de una PCR en la que la detección del producto se realiza en tiras de nitrocelulosa marcadas con sondas específicas para las diferentes especies de micobacterias.

El sistema “GenoType®” amplifica el gen que codifica por el ARNr23S; existen diversas tiras para diferentes niveles de identificación. Un primer formato de tiras (“GenoType CM®”) permite la identificación del complejo *M. tuberculosis* en conjunto, además de otras 13 especies de micobacterias implicadas más frecuentemente en clínica. Si no se llega a un diagnóstico, existe otro formato (“GenoType AS®”) que incluye 16 especies adicionales. Por último, existe un tercera tira (“GenoType MTBC®”) para la identificación de las especies que forman el complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. canetti*) (Toro C. y Amor, A., 2010).

En el caso de las pruebas de susceptibilidad, se han descrito numerosas técnicas moleculares que detectan mutaciones en genes relacionados con resistencia, entre éstas se incluyen técnicas de hibridación o amplificación de segmentos de genes, entre otros métodos basados en PCR y al igual que para las técnicas moleculares de identificación, éstas permiten un diagnóstico rápido y certero de la resistencia o susceptibilidad de *M. tuberculosis*.

A pesar de lo anterior, no se han identificado todos los posibles genes relacionados con resistencia a todas las drogas antituberculosas, ni se han descrito todos los posibles sitios de mutación en estos genes, tal limitación impide una independencia total de los métodos fenotípicos convencionales. Es importante tomar en cuenta que estas metodologías, cuando se utilizan de rutina por largos períodos de tiempo, no están exentas de resultados falsos positivos, debido a la presencia de amplicones contaminantes y/o ADN cromosomal. (Kim, S. 2005)

Con el fin de minimizar las posibles contaminaciones es necesario que en los laboratorios donde se realicen estos procedimientos se cuente con al menos tres áreas separadas, una para el proceso de extracción de ADN, otra para la preparación de la mezcla de reacción (cuarto “limpio”) y un tercer cuarto (cuarto “gris”) dedicado al manejo de ADN no amplificado, donde el ADN extraído se introduce a la mezcla de reacción. Los materiales como pipetas y puntas deben ser exclusivos para cada área y no deben intercambiarse entre las mismas. Las áreas deben ser limpiadas y descontaminadas periódicamente para lo cual el laboratorio debe contar con los desinfectantes y soluciones limpiadoras adecuadas.

Es posible adelantar el resultado si se amplifica en cultivos precoces alguna región específica del cromosoma del bacilo que puede ser luego identificada con sondas, o analizando los fragmentos que resultan luego del tratamiento con enzimas que lo cortan. Sin embargo, no se recomienda la incorporación de métodos que requieran transferir segmentos de ácidos nucleicos amplificados a otro tubo o a un soporte cualquiera, en laboratorios que no cuenten con los requerimientos para realizarlo (disponibilidad de tres laboratorios o áreas separadas, material descartable y protegido de aerosoles en cada laboratorio, personal muy entrenado, ropa de uso exclusivo en distintas áreas, etc.).

La realización de estas pruebas es competencia del CNRM, sin embargo, en caso de que un laboratorio de la Red esté en capacidad de ejecutarlas, éste debe de tomar en cuenta la relación costo-beneficio y escoger el método adecuado a su volumen de trabajo, además, es deber del laboratorio clínico adherirse a las normas, instrucciones y protocolos establecidos por el fabricante para asegurar la validez de los resultados, así como tomar en cuenta las condiciones en que el método ha sido estandarizado y las limitaciones propias tanto de los métodos moleculares en general como del método específico que se realiza en el laboratorio. Los resultados obtenidos a partir de estos métodos en los laboratorios de la Red deberán ser confirmados por el CNRM.

## **8. Bioseguridad en el trabajo con micobacterias**

### **8.1 Descontaminación y desecho del material**

Descartar los desechos en bolsas de bioseguridad colocadas dentro de recipientes de tamaño adecuado al tipo y cantidad de material producido diariamente. La cantidad de recipientes dependerá de la segregación del material, que como mínimo debe ser uno para el reutilizable y otro para el desechable.

Cuando las bolsas se encuentren llenas hasta sus dos terceras partes, cerrarlas y autoclavarlas.

Si no es posible autoclavar, sumergir las muestras en solución de hipoclorito de sodio del 3 al 5% pero dentro de envases con tapa para evitar derrames.

Si ninguno de estos procedimientos 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 envases plásticos es tóxico y los aerosoles que se generan peligrosos. Descontaminar el recipiente en el que se transportó el material con fenol o solución de hipoclorito de sodio del 3 al 5% por fuera y por dentro utilizando guantes.

### **8.2 Precauciones generales de trabajo**

Básicamente es necesario aplicar todas las medidas lógicas y buenas prácticas 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. En caso de disponer de un extractor de aire, mantenerlo trabajando mientras se procesan las muestras, la media hora en que permanecerá el área cerrada luego de la desinfección y para ayudar en la fase de ventilación del área para eliminar los vapores de cloro.

- Al finalizar la tarea y antes de poner en funcionamiento ventiladores y acondicionadores de aire, desinfectar las superficies de mesas donde se realizaron los extendidos y donde se colocaron recipientes con material potencialmente infeccioso, mantener el área cerrada durante media hora como mínimo. En caso de disponer de lámparas de LUV, encenderla por esa media hora. Esperar al menos 5 minutos luego de apagar las LUV antes de volver a entrar y ventilar para eliminar vapores de 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 gabacha cerrada y con mangas largas; no sacarla del centro de salud, donde debe ser lavada con jabón y agua caliente. La gabacha es útil para proteger de las sustancias químicas, colorantes y salpicaduras accidentales con muestras, pero no contra la infección por vía aérea.

- Utilizar mascarillas N95, es decir, que aseguren al menos 95% de protección, que retengan partículas del orden de los 0,3 micrómetros o menos, que tengan cierre seguro por sobre la nariz y alrededor de la boca (deben cumplir las normas NIOSH). Las máscaras o cubrebocas de cirugía dejan pasar el bacilo de la tuberculosis y dan una falsa sensación de seguridad, por lo que no deben utilizarse en el trabajo con TB.

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 (por ejemplo, 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 en nuestro país, son de uso obligatorio.

Son necesarios los guantes para limpiar derrames y 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, no 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.

Los trabajadores de salud infectados con VIH, con otra enfermedad inmunosupresora, con tratamientos prolongados con inmunosupresores (como corticoides) o diabéticos, no deben trabajar en áreas de riesgo, en particular en el laboratorio de tuberculosis.

### 8.3 Precauciones en la toma y manipulación de las muestras

- Recolectar las muestras de esputo en un lugar bien ventilado y alejado del tránsito de personas, nunca en el laboratorio, utilizando frascos de boca ancha y cierre hermético.
- 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. Cuando se reciban en ventanilla, colocar las muestras en la caja con tapa hermética para mantenerlas allí, así como para trasladarlas hasta el área de trabajo.
- 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 envase con de hipoclorito de sodio al 1%.
- Trabajar con un mechero entre los envases con las muestras y el analista 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.

### 8.4 Manipulación y uso de desinfectantes

Para tratar muestras y todo lo que haya estado en contacto con ellas (aplicadores, derrames), usar hipoclorito de sodio (lejía, cloro o blanqueador) 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 y paredes 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 cloro de buena calidad. Mantenerla protegida de la luz, en un lugar fresco y con la tapa bien cerrada para evitar que se deteriore. En los envases se indica la fecha de envasado, que debe ser controlada al adquirirlo. Las diluciones deben ser hechas inmediatamente antes de utilizar el desinfectante, porque pierde actividad rápidamente.

### **Manipulación de otras sustancias químicas**

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

## **9. 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 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 o al 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 a la jefatura correspondiente 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 lo valore, le dé seguimiento y disponga la administración de quimioprofilaxis si es pertinente.



## 9.1 Plan de contingencia para accidentes de trabajo

Los accidentes más graves son los que involucran la rotura de tubos o botellas con cultivos positivos, por el alto número de bacilos que contienen:

- Todo accidente debe atenderse conforme al protocolo establecido y que aparece en el anexo 8 de este manual y que debe incluir la evaluación médica del personal involucrado.
- Autoclavar los recipientes o contenedores de tubos de la centrífuga cerrados si se sospecha o se comprueba alguna rotura interna.
- Si se rompe material (potencialmente) infeccioso fuera de la cabina de seguridad, fuera de rotores o recipientes cerrados autoclavables, de inmediato hacer retirar el personal del área, ponerse respirador N95 o N99, si no están siendo utilizados, rociar el área afectada con hipoclorito de sodio entre el 3 y el 5%, cubrir con papel y rociar nuevamente con hipoclorito de sodio entre el 3 y el 5%. Retirarse del área, dejar actuar el desinfectante durante 30 minutos, recoger luego con guantes y una pinza el material roto dentro de un recipiente autoclavable conteniendo fenol al 5%. Volver a desinfectar la superficie afectada con hipoclorito de sodio entre el 3 y el 5% y ventilar el laboratorio antes de retomar las tareas.
- Registrar cada accidente haciendo constar la fecha, el nombre de la(s) persona(s) involucrada(s) y el número que identifica la(s) muestra(s) o el/los aislamiento(s) que estaba manipulando. El resultado del cultivo y eventualmente de la prueba de sensibilidad correspondiente a este material permitirá orientar la quimioprofilaxis de la persona accidentada, en el caso en que el médico que lo asiste decida administrarla.

## 10. Información y control médico del personal de laboratorio

- Los trabajadores de salud infectados con VIH, con otra enfermedad inmunosupresora, con tratamientos prolongados con 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.
- El personal de nuevo ingreso 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 procedimiento basado en la normativa nacional, que el personal debe conocer y aplicar. 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, dilucidar las causas de los accidentes que pudieran haberse producido y realizar las correcciones que fueran necesarias en la rutina de trabajo.
- El personal del laboratorio debe estar en un programa regular de control médico, siguiendo la normativa (anexo 11) y las directrices establecidas por el PNCTB. El

director de cada laboratorio *debe asegurar que el personal a su cargo tenga como mínimo una evaluación médica anual.*

- Cuando el personal presente síntomas respiratorios compatibles con la definición de caso de TB, se deberá referir de inmediato a control médico. 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 CNRM centraliza el control de calidad de los medios de cultivo elaborados. Asimismo, confirma el diagnóstico hecho por la red, mediante baciloscopía, cultivo o técnicas de biología molecular, entre otros.**

- Debe de existir en cada centro de salud y laboratorio, un procedimiento para la notificación inmediata de cualquier accidente de trabajo.

## 11. Supervisión

El CNRM centraliza el control de calidad de los medios elaborados y analiza el aporte del cultivo al diagnóstico de tuberculosis. Asimismo, confirma el diagnóstico hecho por la red, mediante baciloscopía, cultivo o técnicas de biología molecular. Corresponde al CNRM con sede en el Inciensa, mantener la calidad de las técnicas y procedimientos descritos en este manual, por medio de la capacitación y supervisión permanente del personal a cargo del diagnóstico de la tuberculosis, a lo largo y ancho del territorio nacional.

Para cumplir con esta obligación, el CNRM aplica métodos de supervisión directa e indirecta a los laboratorios.

### 11.1 Supervisión indirecta

#### *A. Supervisión técnica mediante confirmación diagnóstica*

Consiste en la evaluación de las baciloscopías efectuadas por los laboratorios en su trabajo rutinario, teniendo en cuenta la calidad del frotis, coloración, concordancia y reporte según la normativa.

Para ello, cada uno de los laboratorios de la Red debe enviar al CNRM:

- ❖ El 100% de las baciloscopías positivas.
- ❖ El 5% de las baciloscopías negativas, salvo que el CNRM indique otro porcentaje.

Las baciloscopías negativas que se enviarán al CNRM en el INCIENSA, deben ser seleccionadas al azar. Este envío debe efectuarse al menos una vez al mes y en la primera semana de cada mes. Sin embargo, cuando el laboratorio de la Red lo requiera, puede enviar baciloscopías para evaluación urgente y cualquier día hábil de la semana, así como baciloscopías para diagnóstico, o asesoría.

**Si el laboratorio de la red tiñó varias láminas por muestra, envíe únicamente las que revisó.**

### ***B. Supervisión técnica mediante evaluación del desempeño***

La evaluación del desempeño está dirigida al personal a cargo de realizar cotidianamente las baciloscopías. Consiste en la revisión de muestras negativas y/o positivas por bacilos alcohol ácido resistentes y su comparación con el resultado esperado, que fue establecido de previo por el Centro Nacional de Referencia de Micobacteriología.

Tiene como objetivo evaluar la competencia del personal a cargo de realizar las baciloscopías de muestras teñidas con Ziehl Neelsen, el proceso de tinción, observación y reporte conforme a la norma.

Esta evaluación mediante incógnitas tiene por lo general una periodicidad anual.

### ***Actividades a cumplir ante la identificación de discordancias.***

En caso de que el CNRM encuentre discordancias, deberá proceder de la siguiente manera:

- Envió las observaciones al laboratorio supervisado, las cuales deben ser atendidas a la mayor brevedad. El responsable del laboratorio debe aplicar las medidas correctivas pertinentes y si es necesario, enviar nuevo reporte de baciloscopía al expediente del paciente o solicitar una nueva muestra o serie de muestras y retomar el caso.
- Si es necesario devolverá la lámina al responsable para que corrobore el resultado.
- La reiteración de discordancias será motivo de capacitación del personal responsable de las baciloscopías, a través de una capacitación coordinada por el CNRM.
- Luego se determinará el impacto de dicha capacitación y la conveniencia de que el responsable continúe efectuando baciloscopías.

## 11.2 Supervisión directa mediante inspecciones de calidad

### A. Entrevistas

La entrevista con el personal encargado de procesar las muestras por BK permite conocer las condiciones de trabajo, el cumplimiento con los procedimientos, e identificar inconformidades. Estas entrevistas se llevan a cabo durante las inspecciones de calidad realizadas a los laboratorios.

### B. Supervisión del laboratorio

La supervisión de laboratorio, tiene como objetivos evaluar las condiciones de las áreas de trabajo; la recolección y recepción de muestras; la disposición y uso de las barreras de protección, primarias y secundarias; aseguramiento de la calidad; normativa y equipos; entre otros.

Se lleva a cabo durante una visita del personal del CNRM, a cada uno de los laboratorios de la Red y guiada por un formulario que se debe estar adecuando a los nuevos requerimientos, conforme a las políticas de mejoramiento continuo de la calidad.

### C. Supervisión administrativa

Consiste en evaluar la calidad de la información incluida en los registros del laboratorio, el uso y llenado correcto de los formularios de solicitud de confirmación diagnóstica o de diagnóstico, el envío de las muestras al CNRM para lo que corresponda y la documentación sobre equipos y demás procedimientos, en apego a lo indicado en este manual.

## 12. Normas para el área física y el equipo del laboratorio que procesa muestras por Tuberculosis.

- El área de trabajo destinada para baciloscopía debe tener como mínimo 4 m<sup>2</sup>.
- Las paredes, suelo y techo del laboratorio deben ser lisos, fáciles de limpiar, impermeables y resistentes a las sustancias químicas y a los desinfectantes comúnmente utilizados en el laboratorio. Los pisos no deben ser resbalosos.
- No deben haber muebles aéreos, ya que obstaculizan el manejo apropiado de las muestras y pueden provocar accidentes.
- La superficie de la mesa de trabajo debe ser impermeable, no porosa, resistente a los desinfectantes.
- Debe haber una puerta para cerrar el recinto cuando se procesan muestras. La puerta preferiblemente debe cerrarse por sí sola y tener manija.
- El área de trabajo debe estar bien ventilada o tener extractor de aire. La salida del extractor no debe dar a pasillos ni otros lugares donde puedan

transitar pacientes o personal del centro de salud. Lo más recomendable es que tenga salida al techo, a al menos 1,5 metros sobre éste.

- Verificar que el aire y el material (potencialmente) infeccioso se desplacen en una única dirección desde áreas de trabajo de menor riesgo a las de mayor riesgo.
- Debe haber buena iluminación.
- Debe haber una pila en el área o cercana de ésta.
- Debe haber una lámpara de luz ultravioleta micobactericida (de 254nm) ubicada sobre la mesa de trabajo (a unos 40 cm de la superficie de la mesa), con pantalla. El interruptor de la luz UV debe estar fuera del área de trabajo con las instrucciones de uso. Puede instalarse otra lámpara de LUV micobactericida arriba de la puerta de entrada, aunque esto último es prescindible.
- Señalizar el laboratorio con un cartel que indique riesgo biológico y acceso restringido a personal entrenado y autorizado, e identifique y permita ubicar al responsable del laboratorio.
- No permitir el acceso de personal de limpieza o mantenimiento si no están bajo supervisión del personal de laboratorio entrenado, o si no es personal entrenado especialmente y debidamente autorizado
- Eliminar roedores o artrópodos que pueden ser vehículos de bacilos mediante la desinfección periódica con productos activos contra estos animales.
- Guardar los elementos que no estén en uso, mantener ordenado el material y equipo necesarios en el laboratorio
- Asignar a cada empleado la responsabilidad de mantener el orden, limpieza y desinfección del área donde ha trabajado y de áreas de uso común.

### **12.1 Indumentaria y Equipo de Protección Personal (EPP)**

- No utilizar anillos ni ningún tipo de joya o bisutería, incluyendo el reloj, mientras se trabaje en el laboratorio
- Utilizar ambos (equipo de pantalones o faldas y blusón) para promover el reemplazo de la ropa de calle durante las horas de trabajo y para brindar mayor protección contra posibles salpicaduras.
- No utilizar la ropa de trabajo fuera del laboratorio. Si es reutilizable, descontaminarla antes de lavarla
- No guardar la ropa de trabajo junto con la ropa de calle. Finalizada la tarea, es conveniente dejar los guardapolvos/batas o ambos bajo una LUV.
- Tener disponibles a la vista de todo el personal, respiradores tipo N95 o N99.

### **12.2 Precauciones generales para el procesamiento de muestras**

- Lavarse frecuentemente las manos

- Utilizar guantes desechables para manipular material (potencialmente) infeccioso. Tener presente que las muestras pueden contener otros microorganismos además del bacilo de la tuberculosis, incluyendo el virus de la hepatitis B o del VIH. Quitárselos inmediatamente al terminar el trabajo y descartarlos. No tocar con ellos puertas, teléfonos, llaves, lavamanos, ni equipo.
- Reemplazar material de vidrio por material de plástico toda vez que sea posible. En especial utilizar tubos de plástico para centrifugar.
- Revisar los tubos antes de utilizarlos. Descartar los que parezcan dañados o defectuosos.
- Nunca pipetear con la boca en el laboratorio, ni siquiera cuando se opera con soluciones estériles.
- Mezclar suspensiones y soluciones dentro de un tubo cerrado, por agitación manual o mecánica, nunca pipeteando.
- No expulsar con fuerza el líquido de una pipeta.
- Descartar las pipetas en un recipiente con tapa que contenga hipoclorito de sodio al 1%, ubicado dentro de la cabina, hasta el momento en que sean autoclavadas dentro de ese mismo recipiente.
- Tapar cada uno de los tubos de ensayo inmediatamente después de utilizarlo, y antes de descartarlo en el recipiente donde serán autoclavados
- Descontaminar con hipoclorito de sodio 1% el exterior de los recipientes que contienen soluciones estériles, las superficies de trabajo, el rotor y los cestillos contenedores de tubos de la centrífuga al finalizar la tarea.

### 12.3 Procesamiento y desecho de material contaminado

Deben respetarse las normativas vigentes para el desecho de material biológico patógeno. Mínimamente deberán observarse las siguientes precauciones:

- Descartar y transportar el material (potencialmente) infeccioso en contenedores seguros, cerrados y que resistan el autoclavado, de acero inoxidable o plástico polipropileno. Pueden ser utilizadas bolsas autoclavables para separar distintos tipos de material dentro de ellos. Siempre deben utilizarse estas bolsas para descartar material de plástico que se funde con el calor durante el autoclavado
- Mientras se realizan los procedimientos del laboratorio separar en contenedores distintos el material

- **que será desechado**
- **que será reciclado**
- **cortante o punzante**

Colocar el material cortante o punzante en recipientes a prueba de perforación y que puedan ser autoclavados, sin extraer el material.

- No utilizar contenedores muy grandes, no compactar el material dentro de ellos ni llenarlos sino hasta sus dos terceras partes, para permitir que el vapor del autoclave penetre adecuadamente.

- No descartar material que no esté previamente autoclavado. Autoclavar diariamente el material a desechar y reciclar, luego de finalizada la tarea. No dejar acumular el material de varios días.
- Controlar la efectividad del proceso de esterilización. Se comercializan indicadores de distinto tipo, químicos y biológicos para este fin que viran de color cuando el proceso ha sido efectivo. Los controles biológicos requieren incubación normalmente de 24 a 48hr, aunque deben seguirse las indicaciones del fabricante.
- Reemplazar los burletes de la tapa de la autoclave que estén deteriorados, para asegurar el cierre hermético y evitar el escape del vapor del agua. Mantener la limpieza de la cámara de la autoclave y de las válvulas de escape
- Disponer los recipientes en forma no compacta dentro de la autoclave, para permitir el acceso del calor en forma homogénea
- Autoclavar el material contaminado durante una hora a partir del momento en que se hayan alcanzado los 121 °C y se haya purgado el aire de la autoclave a través de su válvula. Resulta práctico uniformar los tiempos de esterilización en una hora, aunque en muchos casos la esterilización se alcanza en menos tiempo, dependiendo del volumen del material colocado, de la consistencia del contenido de los envases (líquido o sólido), de la forma en que se ha ubicado dentro del autoclave, de la carga y tipo de gérmenes que tenga y de la altitud a la que se esté trabajando.

Se logra esta presión calentando el agua que se coloca en el interior de la autoclave hasta ebullición y permitiendo que se sature toda la cámara con vapor.

Se debe remover todo el aire del interior del autoclave a través de su válvula, para que quede totalmente saturada con vapor de agua, de lo contrario la temperatura que se alcanza a la misma presión es menor.

- Permitir que la autoclave enfríe antes de abrirlo para evitar quemaduras con vapor y líquidos muy calientes.

#### **12.4 Utilización de tubos que emiten luz UV**

Su empleo es optativo, son útiles para complementar la acción de los desinfectantes sobre superficies de trabajo, instrumentos utilizados, ropa de trabajo, pero no como elemento único de descontaminación.

- Ubicarlos a no más de 40 cm de distancia de la superficie a tratar.
- Encenderlos después de completado el trabajo, y al retirarse del laboratorio. No permanecer en el laboratorio con los tubos UV encendidos porque pueden dañar los ojos y desencadenar cáncer de piel. Las cabinas de seguridad biológica tienen por lo general cristales protectores contra la luz UV.
- Irradiar durante 1 a 2 horas
- Limpiar el tubo UV cada semana con etanol entre el 70 y el 80%, la intensidad es afectada drásticamente por la acumulación de polvo y suciedad.
- Reemplazar el tubo periódicamente. Es activo durante 7.000 a 9.000 horas de uso, dependiendo del tipo. Se debe llevar un registro que permita determinar las horas de uso y así asegurarse de cambiarlo antes de que baje su eficacia.

## 12.5 Mantenimiento de la higiene de refrigeradores y estufas de cultivo

- Limpiar y desinfectar periódicamente con solución de hipoclorito de sodio al 1% los estantes, paredes y recipientes de refrigeradores y estufas utilizados para mantener muestras de pacientes o cultivos positivos. El personal de laboratorio entrenado debe hacerse cargo de esta tarea utilizando guantes.
- Autoclavar y desechar el material no identificado.

## 13. Precauciones para la derivación de cultivos positivos al CNRM

Los cultivos positivos contienen muy alto número de bacilos vivos patógenos y por lo tanto su transporte genera muy alto riesgo, mucho mayor si deben transportarse. El riesgo se complica cuando se movilizan cultivos de bacilos que son resistentes a las drogas. Sin embargo, es posible hacerlo en forma segura si se toman todas las precauciones para no exponer a las personas que los transporten y a quienes los reciban.

Se debe respetar la reglamentación internacional y nacional vigente. El PNCTB y el Nivel de Referencia Nacional de la red de laboratorios deben procurar lo necesario y establecer una organización que permita que los cultivos puedan ser transportados con bioseguridad y, a la vez, en forma rápida y sin impedimentos.

El traslado en mano de este tipo de material está prohibido.

El remitente es responsable del envío.

Requisitos mínimos para el transporte seguro de cultivos positivos de *M. tuberculosis*

- Acondicionar los tubos a enviar con triple envase, de la siguiente forma:
  - Asegurar el rótulo y el cierre hermético de la tapa del tubo que contiene el aislamiento (cultivo positivo), colocar una cinta adhesiva alrededor de la tapa. Es el primer envase.
  - Envolver cada tubo con material que amortigüe y pueda absorber todo el contenido del tubo en caso de accidente en tránsito, puede ser una capa de algodón de 2 cm de espesor.
  - Colocar el tubo así protegido dentro de un segundo envase. Debe ser rígido, impermeable, con cierre hermético y resistente a golpes y presión de gran intensidad. Puede colocarse más de un tubo dentro del segundo envase asegurando que no haya contacto entre ellos
  - Colocar los formularios de solicitud de prueba de identificación/sensibilidad dentro de una bolsa plástica.
  - Ubicar el segundo envase conteniendo el/los tubos y las solicitudes dentro de un tercer envase. Puede ser de plástico, fibra corrugada, cartón duro, madera u otro material de alta resistencia.



Las normas internacionales requieren que este material resista una presión de 95kPa (aproximadamente 1 Kg por cada cm<sup>2</sup>)

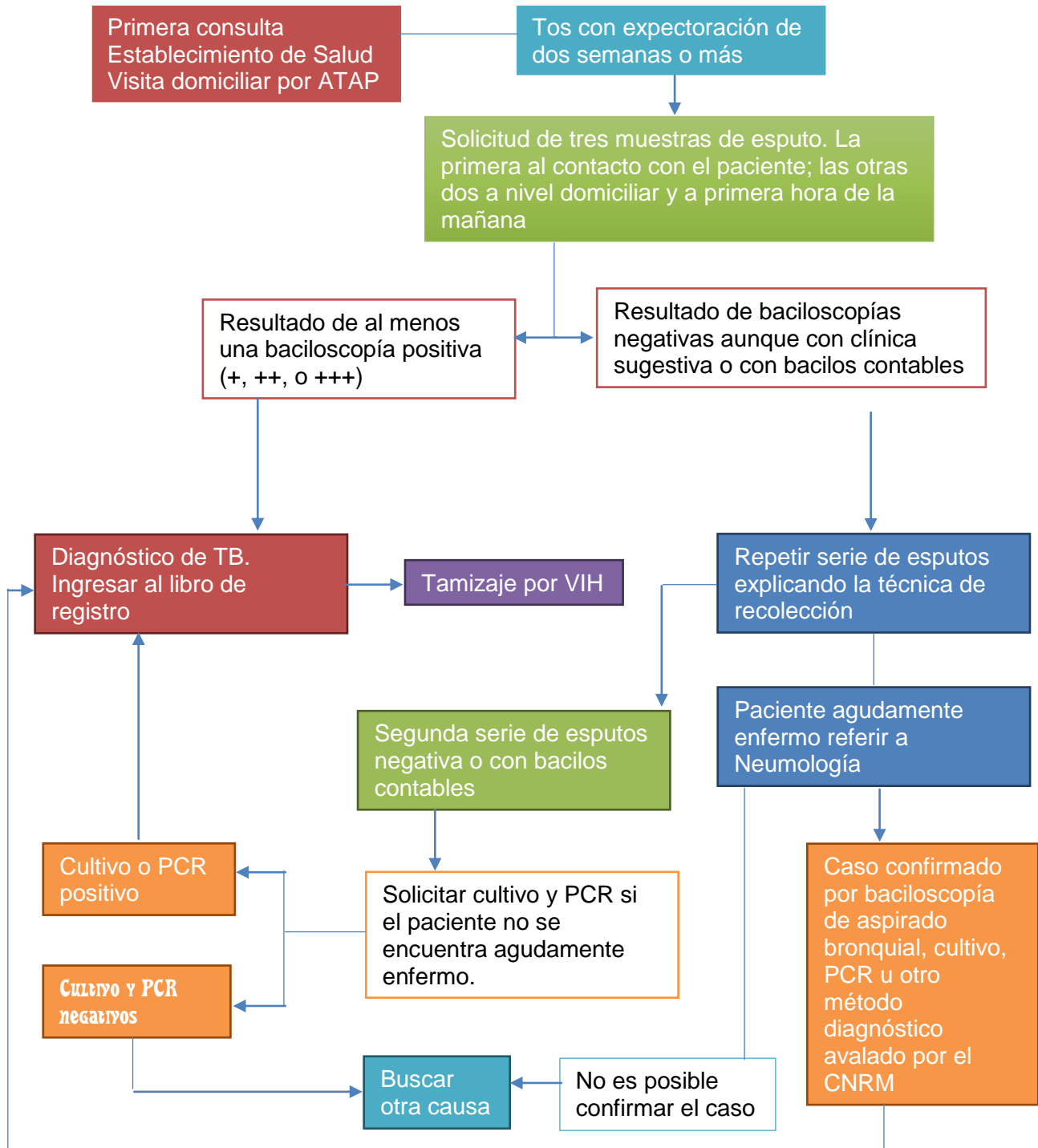
La tercera caja debe estar identificada con una etiqueta bien visible y clara que tenga

- El rótulo “**Riesgo Biológico**”
  - Una flecha que indique el sentido en el que debe mantenerse la posición de la caja para que los tubos queden en posición vertical con la boca hacia arriba
  - Nombre de la institución y del responsable que realiza el envío, dirección, número de teléfono/fax
  - Nombre del profesional al que se envía el material, dirección, número de teléfono (y Fax) del CNRM.
- 
- Entregar el material a personal entrenado para transportarlo y para actuar en caso de accidente
  - Comprobar que arribe según lo esperado.

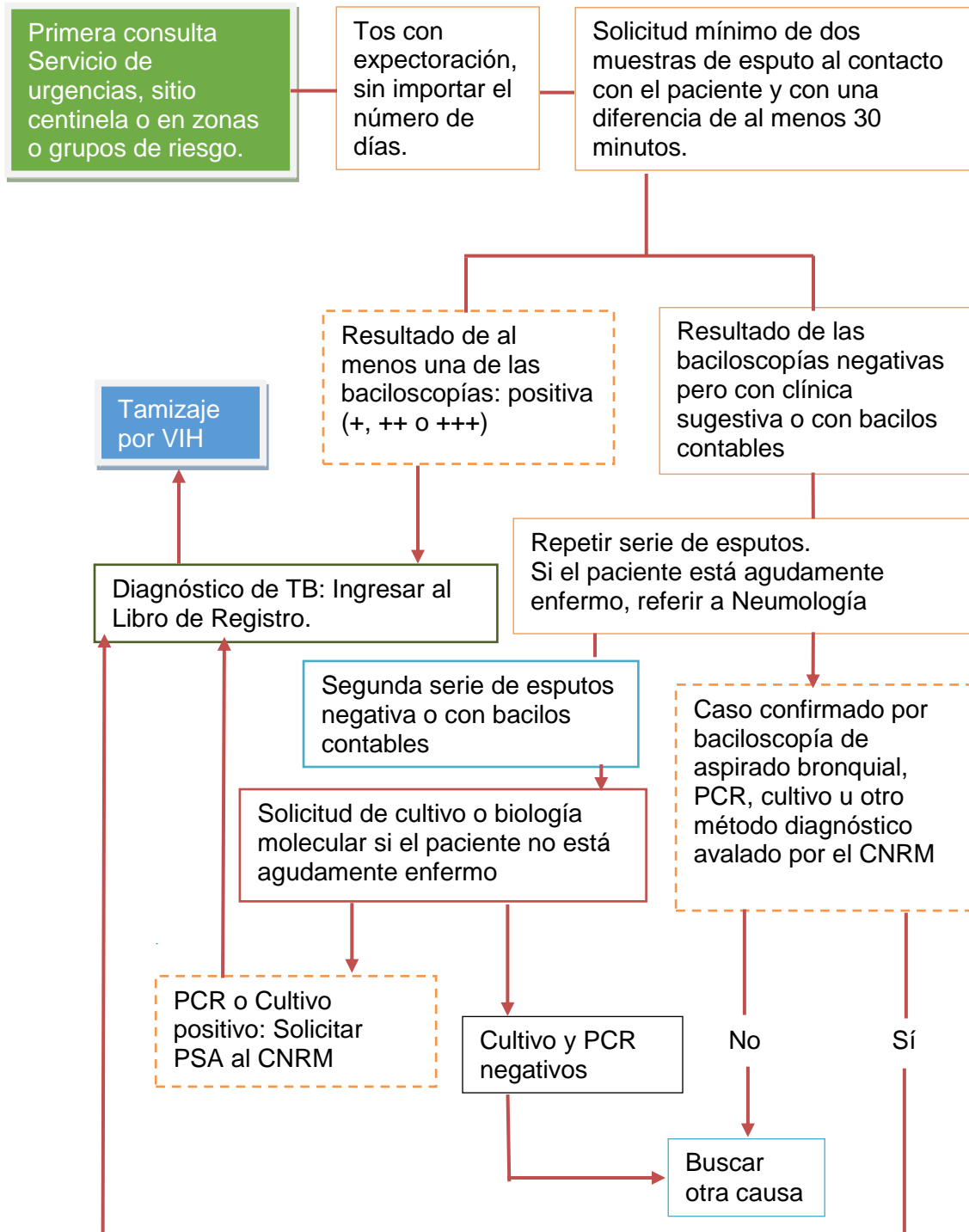
El personal del CNRM desempaquetará los aislamientos en cabina de seguridad biológica.

**14. ANEXOS**

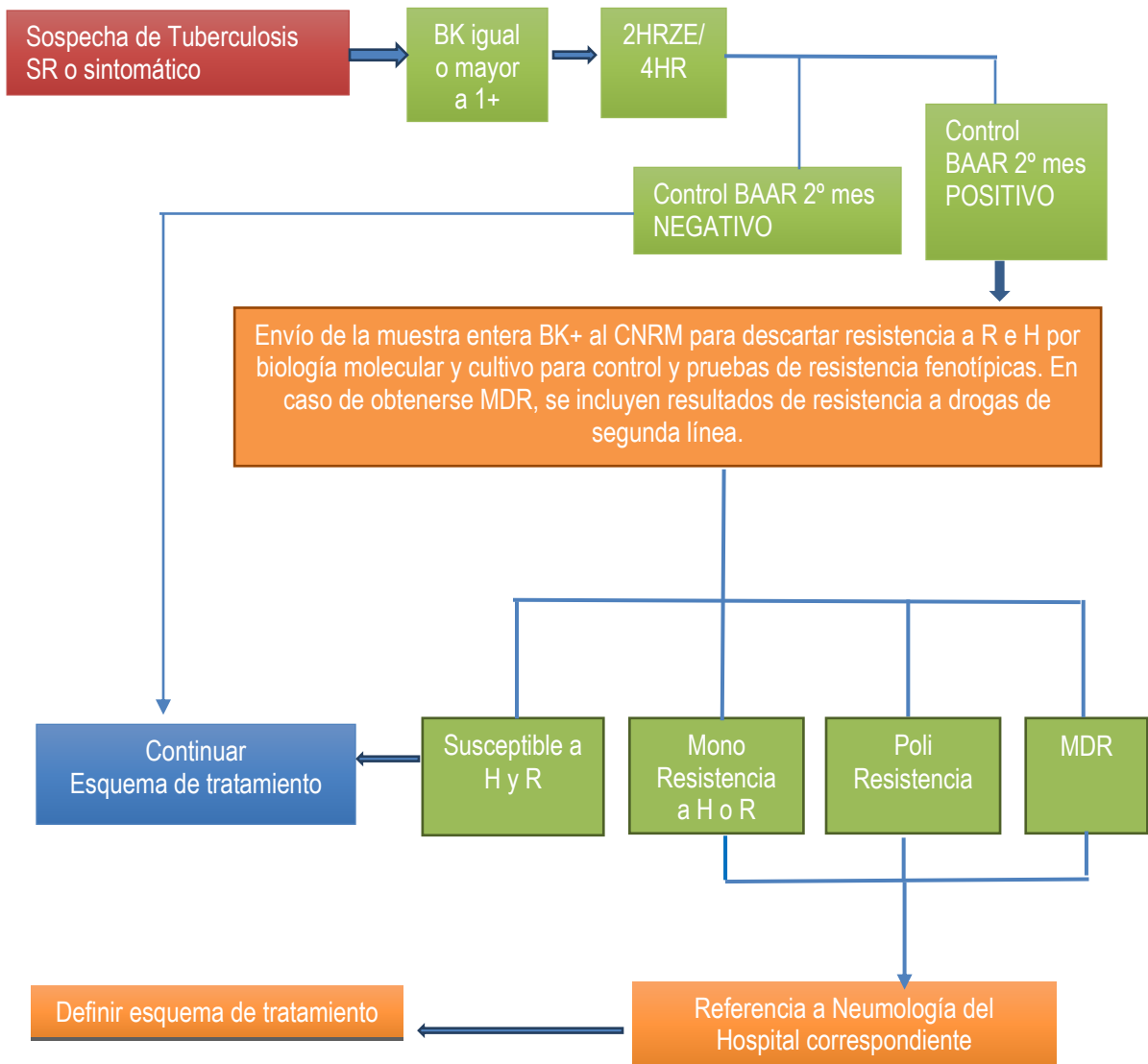
# 1. Diagrama de flujo para el diagnóstico de TB: Búsqueda pasiva



## 2. Diagrama de flujo para el diagnóstico de TB: Búsqueda activa

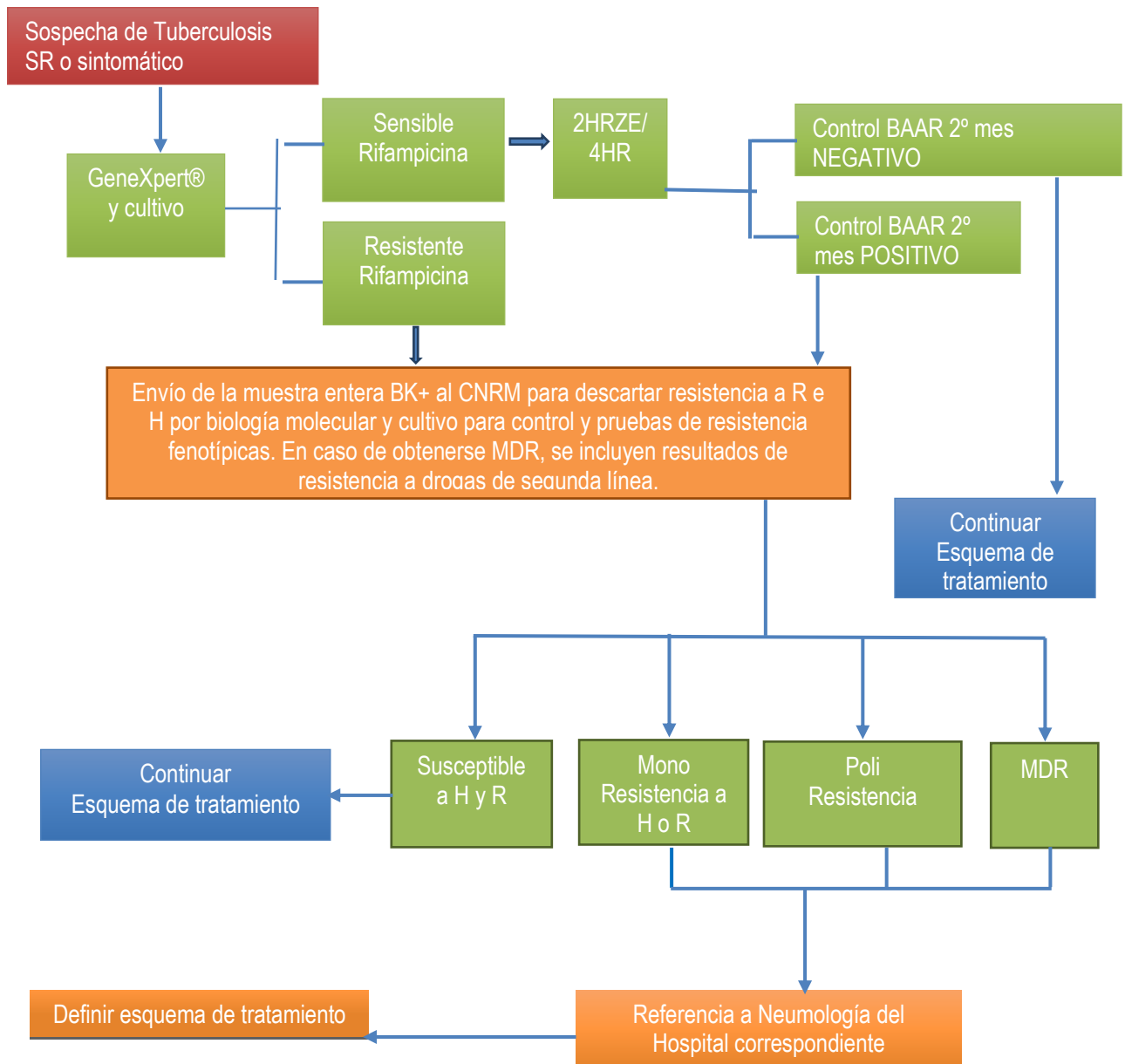


### 3. Diagrama de flujo para el diagnóstico de resistencia a medicamentos de primera línea en casos nuevos.

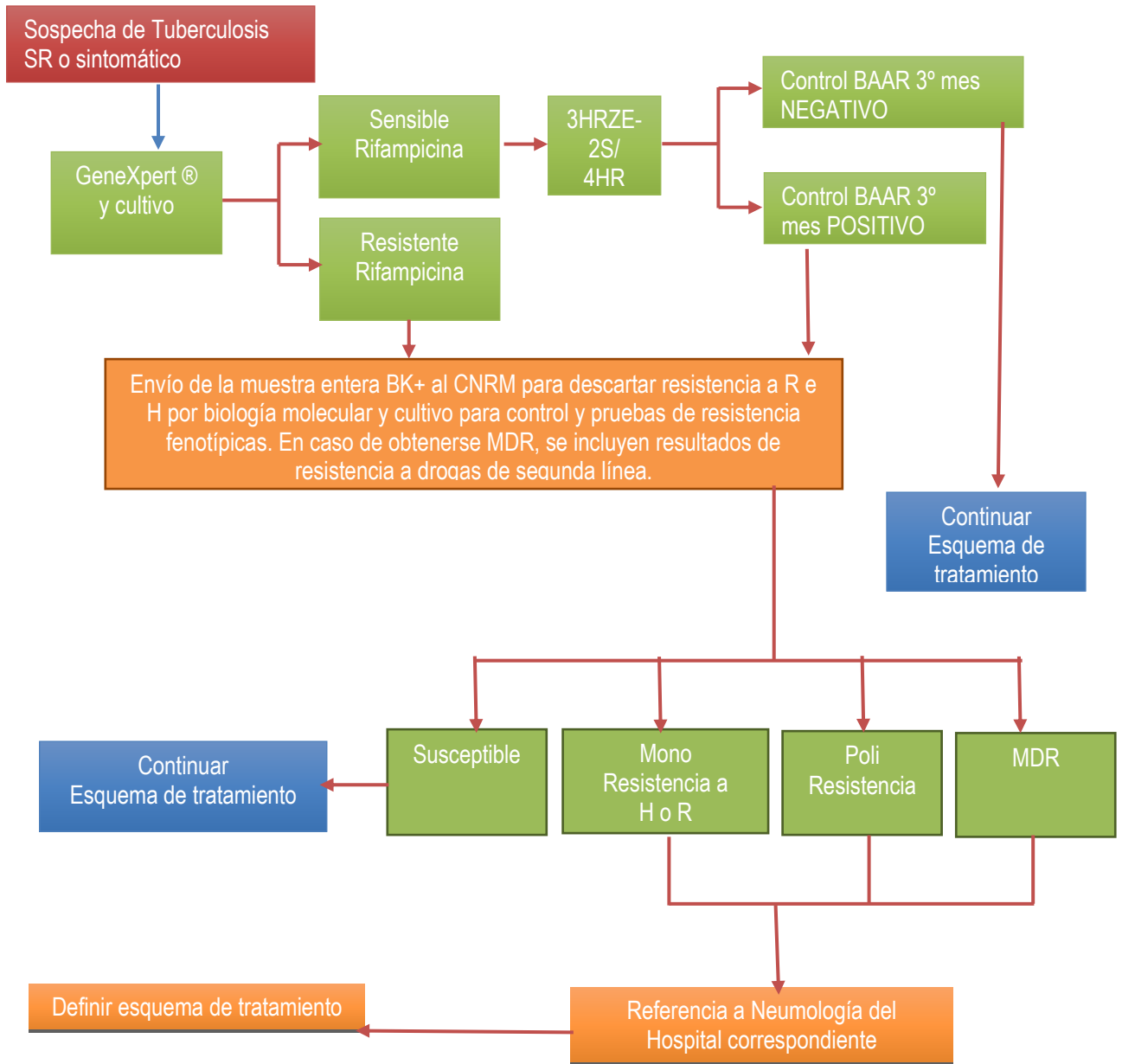


**NOTA:**  
 El SeeGene® (biología molecular empleada por el CNRM) puede identificar si está afectado el gen KatG (de no ser así puede utilizarse H en altas dosis).

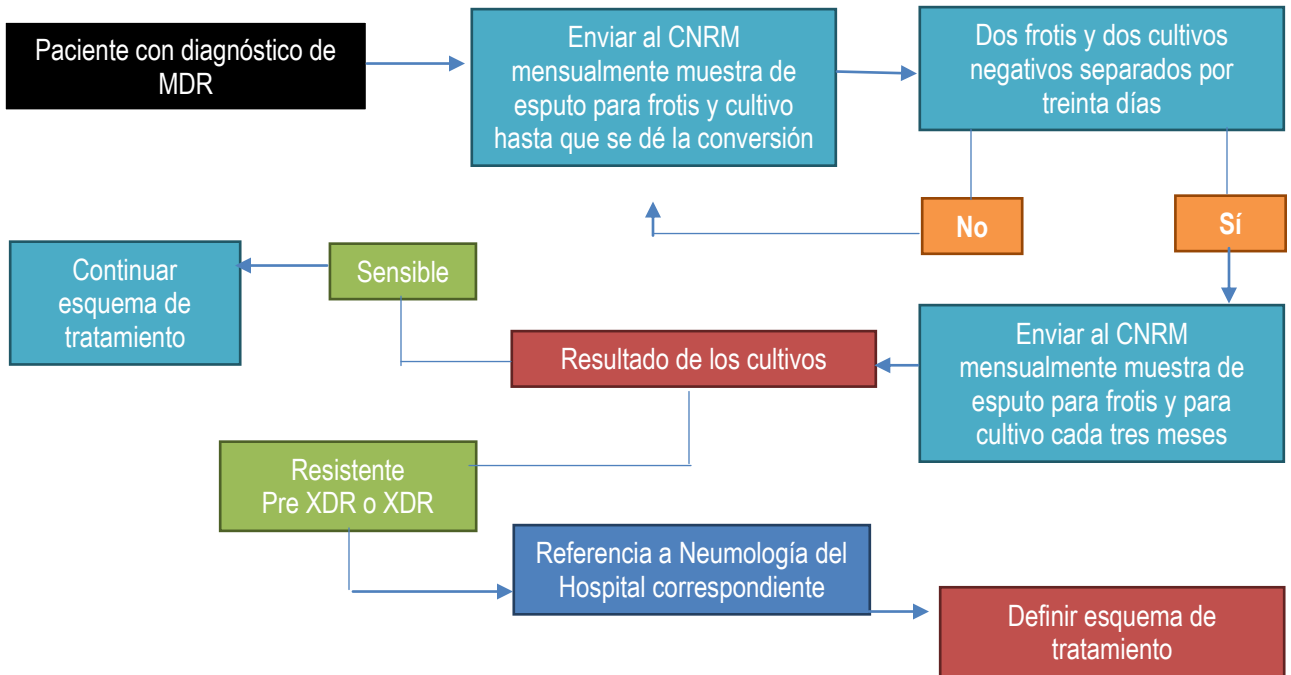
**4. Diagrama de flujo para el diagnóstico de resistencia a medicamentos de primera línea en casos nuevos en grupos de riesgo: indígenas, privados de libertad.**



**5. Diagrama de flujo para el diagnóstico de resistencia a medicamentos de primera línea en casos antes tratados.**



## 6. Diagrama de flujo para el diagnóstico de resistencia a drogas de segunda línea en pacientes con multirresistencia.



1. MDR diagnosticados (se realiza frotis y cultivo mensuales hasta que haya conversión –dos frotis y dos cultivos negativos separados por treinta días-)
2. Conversión MDR, frotis mensual y cultivo cada tres meses.



## 7. 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, (C<sub>19</sub> H<sub>18</sub> 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.

- Ácido 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%, divide 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 al CNRM sobre su calidad ya que ésta es muy variable.

- Mantener un registro con la fecha de fabricación, el volumen de cada reactivo que se ha preparado y el resultado del correspondiente control de calidad

## **8. 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.

## 9. Recolección de muestras; instrucciones para el paciente

Recolección de las muestras de esputo (también conocido como flema, gargajo, cuecha, gallo, fondo de pecho, entre otros).

1. Rotule el envase de recolección con su nombre o número de identificación (cédula o pasaporte) 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.
2. 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. No deben elegirse los lugares cerrados o por los que transitan personas.

Teniendo el frasco ya rotulado y listo, ahora prepárese para recoger la muestra. Haga lo siguiente:

- inspire profundamente llenando sus pulmones de aire tanto como sea posible
- retenga el aire un momento
- expulse luego la flema con un esfuerzo de tos, tratando de arrastrar las secreciones del pulmón
- recoja la flema producida 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 trozo de papel y lávese las manos con agua y jabón

Esto debe hacerlo para recoger cada una de las muestras que se le solicitaron en días consecutivos o con media hora de diferencia.

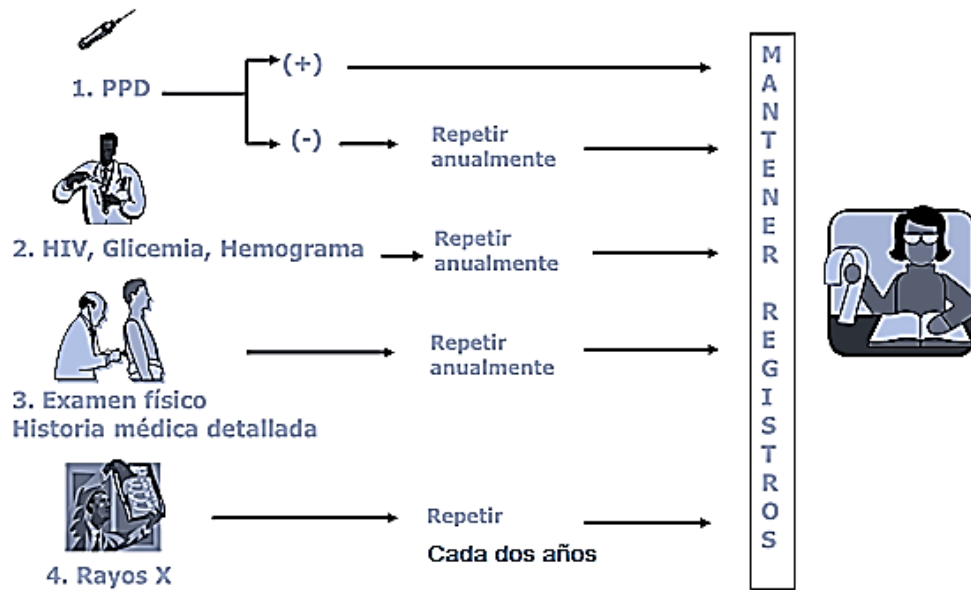
## 10. Requisitos mínimos para el área de trabajo para baciloscopías por BK

- El área de trabajo destinada para baciloscopia debe tener como mínimo 4 m<sup>2</sup>.
- Las paredes, suelo y techo del laboratorio deben ser lisos, fáciles de limpiar, impermeables y resistentes a las sustancias químicas y a los desinfectantes comúnmente utilizados en el laboratorio. Los pisos no deben ser resbalosos.
- No deben haber muebles aéreos, ya que obstaculizan el manejo apropiado de las muestras y pueden provocar accidentes.

- La superficie de la mesa de trabajo debe ser impermeable, no porosa, resistente a los desinfectantes.
- Debe haber una puerta para cerrar el recinto cuando se procesan muestras. La puerta preferiblemente debe cerrarse por sí sola y tener manija.
- El área de trabajo debe estar bien ventilada o tener extractor de aire. La salida del extractor no debe dar a pasillos ni otros lugares donde puedan transitar pacientes o personal del centro de salud. Lo más recomendable es que tenga salida al techo, a unos 1,5 metros sobre este.
- Debe haber buena iluminación.
- Debe haber una pila en el área o cercana de ésta.
- Debe haber una lámpara de luz ultravioleta ubicada sobre la mesa de trabajo (a unos 40 cm de la superficie de la mesa), con pantalla. El interruptor de la luz UV debe estar fuera del área de trabajo con las instrucciones de uso y con registro actualizado de las horas de uso para no sobrepasar su vida útil. Puede instalarse otra lámpara de LUV arriba de la puerta de entrada, aunque esto último es prescindible. La emisión micobactericida es de alrededor de 254nm.
- No se requiere de cámara de bioseguridad para la realización de frotis.

## 11. Control médico

### Control médico del personal de laboratorio



La placa de tórax será cada dos años, salvo que la PPD reaccione igual o mayor a 5mm, en cuyo caso, se solicitará radiografía si el funcionario presenta clínica sugestiva de TB

## 12. Atención de accidentes

- 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.



### 13. Registro para control de calidad interno de reactivos de coloración

#### CONTROL DE CALIDAD INTERNO PLANILLA DE CONTROL DE REACTIVOS DE COLORACIÓN

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

1 Consignar buena o mala  
2 Consignar si o no

## 14. Registro para control de calidad externo

### 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 |  |
|-----|-----|---------------------|---|---------------------------|----|--------------------------|------------|---------------|----------------|--|-----------------------------------|--|
|     |     | 1                   | 2 | positivas concordancia %  | Nº | negativas concordancia % | Muestras % | Extendidos %  | Coloraciones % |  |                                   |  |
|     |     |                     |   |                           |    |                          |            |               |                |  |                                   |  |
|     |     |                     |   |                           |    |                          |            |               |                |  |                                   |  |
|     |     |                     |   |                           |    |                          |            |               |                |  |                                   |  |
|     |     |                     |   |                           |    |                          |            |               |                |  |                                   |  |
|     |     |                     |   |                           |    |                          |            |               |                |  |                                   |  |

1 Relectura de láminas en el laboratorio de referencia

2 Lectura de un panel de frotis recibido del laboratorio de referencia

## 15. Requisitos específicos del laboratorio de cultivo de muestras

Es un laboratorio de acceso restringido al personal técnico y profesional del laboratorio. Los requerimientos mínimos son:

1. Paredes íntegras desde el piso hasta el techo, de manera que el aire no salga de este laboratorio cuando su puerta esté cerrada.
2. Es conveniente un panel de vidrio en puerta que permita visión desde afuera del laboratorio.
3. Superficies de pisos, paredes, techo y mesas de material no poroso, lisas y selladas, cubiertos con materiales y pinturas que resistan el tratamiento con solución de hipoclorito de sodio y eventualmente con fenol al 5%.
4. Fácil acceso al área de descontaminación de materiales.
5. Muy buena iluminación.
6. Agua corriente, gas y electricidad
7. Una pila para hacer coloraciones y otra para el lavado de manos (preferentemente ubicada cerca de la salida del laboratorio).
8. Preferiblemente dos mesas (una para la preparación de frotis y otra para la lectura de cultivos).
9. Lámpara de luz ultravioleta.
10. Espacio suficiente para ubicar una centrifuga, una estufa de incubación, un refrigerador amplio (preferentemente dos, uno para material limpio y otro para muestras y aislamientos) y una cabina de seguridad biológica.
11. Un sistema de extracción de aire (cuando se utilizan cabinas de seguridad biológica, no es indispensable tener un sistema de extracción de aire, aunque lógicamente es conveniente).

También puede instalarse un acondicionador de la temperatura si el clima es muy cálido o muy frío y provoca incomodidad en el personal.

Se debe impedir que funcionen en este laboratorio sistemas de recirculación, calefacción o refrigeración de aire que intercambien aire entre distintas áreas de la unidad de salud, y que generen movimientos de aire sobre la mesa de trabajo. Si existen bocas de estos sistemas dentro del laboratorio, deben ser anuladas y selladas. Tampoco los extractores deben generar movimientos de aire directamente sobre la mesa de trabajo.

Al elegir el sistema de extracción de aire hay que tener presente que debe renovar el aire al menos 6 veces por hora. Cada extractor debe ser ubicado lo más alto posible, en la pared opuesta a la puerta de ingreso, y deben expulsar el aire hacia un área abierta, no transitada, lejos de edificios ocupados y tomas de aire. De esta manera se logra barrer el aire desde las áreas de menor riesgo hacia las de mayor riesgo, para luego expulsarlo hacia el exterior donde los aerosoles quedan diluidos en el espacio abierto y sometidos a la actividad esterilizante de los rayos solares.

Las cuidadosas prácticas de trabajo que deben ser implementadas en esta área minimizan la posibilidad de crear aerosoles y expulsar bacilos con el aire del laboratorio. En consecuencia, el aire no queda estancado dentro del laboratorio, no se acumulan aerosoles en varios días de trabajo y, no regresa el aire del laboratorio a áreas de la unidad de salud donde circula el resto del personal. Se crea presión negativa dentro del laboratorio.

Existen sistemas para verificar visualmente la presión negativa. Un método muy simple consiste en suspender en la puerta de ingreso un pañuelo de papel, pequeño y muy liviano, y verificar que mueva hacia el interior del laboratorio impulsado por el movimiento del aire.

La cabina de seguridad biológica filtra y retiene a los bacilos que pueden quedar suspendidos en las operaciones de mayor riesgo. Es necesario que todos los laboratorios de la red que hacen cultivo estén equipados con este tipo de cabinas y especialmente los laboratorios con mayor nivel de riesgo que son los que tienen alguna de las siguientes tres características:

- procesan con frecuencia muestras con baciloscopía positiva utilizando centrifugación
- obtienen en promedio más de 5 cultivos positivos por mes
- abren cultivos positivos para su identificación o prueba de sensibilidad

La integridad del flujo de aire en la cabina de bioseguridad puede ser perturbada por cualquier corriente de aire que generen los movimientos de personas, ventanas abiertas, apertura y cierre de puertas. Por esta razón debe estar ubicada en un lugar donde la circulación de personal sea la indispensable y lejos de puertas y ventanas que se abran. Conviene dejar un espacio de unos 30 cm libres alrededor del equipo para poder acceder durante las tareas de control y mantenimiento.

Cuando se utilizan cabinas de seguridad biológica, no es indispensable tener un sistema de extracción de aire, aunque lógicamente es conveniente. La extracción puede ser realizada por la misma cabina mientras está en funcionamiento, expulsando el aire a través del ducto hacia el exterior. El técnico que la instale debe asegurar que no haya recirculación de aire hacia el interior del laboratorio por este ducto. La presión negativa se interrumpe al apagar la cabina, por lo que es necesario dejarla en funcionamiento durante todas las horas de trabajo si es el único sistema de extracción de aire.

Las centrifugas de mesa deben estar a una altura cómoda para que pueda verse el rotor y para operar sin dificultad.

Si hay espacio suficiente y es posible contar con laboratorios separados o compartimentos creados con divisiones que no permitan la circulación de aire entre distintas zonas de trabajo, es conveniente ubicar la coloración de frotis en uno, la cabina de seguridad biológica dentro de otro compartimento, y la

centrifuga en un tercero. De esta forma, si se produce algún accidente en la cabina o en la centrifuga, es posible cerrar el laboratorio o compartimiento y contener allí el riesgo hasta solucionar el problema. El aislamiento de la cabina de seguridad biológica también es conveniente cuando es necesario descontaminarla con vapores tóxicos, por ejemplo previo a un cambio de filtros.

Los tubos con luz ultravioleta son económicos y útiles para completar la desinfección de superficies cercanas.

Las cabinas de seguridad biológica tienen un tubo de UV. También pueden ser colocados sobre otras mesas de trabajo, sobre el área donde se deja la ropa de trabajo, sobre la centrifuga.

El personal debe protegerse con batas o gabachas de uso exclusivo para esta área, que se pondrá al ingresar y deberá sacarse al terminar sus tareas y salir. Es necesario entonces organizar un área con percheros y estantes para ordenar la ropa de trabajo en la antecámara, separando la ropa limpia de la utilizada.

### **Área de esterilización de material contaminado**

Aquí se ubican el/los autoclaves utilizados para descontaminar muestras y sobrenadantes que deben ser desechados, y el material de vidrio utilizado con material (potencialmente) infeccioso que debe ser reciclado (tubos, pipetas).

Debe ser fácilmente accesible desde el laboratorio de procesamiento de muestras, de manera que no sea necesario transportar el material contaminado grandes distancias o a través de escaleras/ascensores. Lo ideal es que esté en un cuarto contiguo al laboratorio de procesamiento de muestras, comunicado por una puerta distinta a la de ingreso de muestras y material. Así las muestras y el material que debe ser reciclado siguen el siguiente recorrido en una única dirección:



Luego de esterilizado, se procede al descarte del material desechable, siguiendo las normas operativas del servicio de salud. Como el material fue autoclavado ya no genera riesgo biológico.

El material de vidrio reciclable puede ser trasladado, luego de esterilizado y ya sin riesgo, al área de lavado-preparación-esterilización la que, idealmente, estará ubicada en forma contigua a la de descontaminación de material.

## **Equipo**

### **Autoclave /Estufa de esterilización**

Es necesaria una autoclave para esterilizar material contaminado y otra para el material limpio.

El material de vidrio limpio puede ser esterilizado por calor húmedo o seco si lo resiste. La estufa de esterilización, graduada a baja temperatura, puede ser utilizada también para secar el material limpio autoclavado.

En cambio, el material contaminado es sometido a calor húmedo porque tiene mayor penetración en el material orgánico y esteriliza más rápidamente al bacilo de la tuberculosis y otros gérmenes. También se utiliza calor húmedo para esterilizar soluciones.

La temperatura de esterilización en una estufa con calor seco es de 170°C. Se debe permitir que la temperatura baje antes de sacar el material, de lo contrario el material de vidrio puede quebrarse y se pueden producir accidentes por quemaduras.

La autoclave de vapor, tipo Chamberlain, es el equipo más versátil, de fácil manutención y muy prolongada vida útil para esterilizar con calor húmedo. Se trabaja a 121°C, temperatura que se alcanza con vapor de agua a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada o 1kg/cm<sup>2</sup> o 1 atmósfera. Se logra esta presión calentando el agua que se coloca en el interior de la autoclave hasta ebullición y permitiendo que se sature toda la cámara con vapor. Se debe remover todo el aire del interior del autoclave a través de su válvula, para que quede totalmente saturada con vapor de agua, de lo contrario la temperatura que se alcanza a la misma presión es menor. El tiempo de esterilización debe contarse luego de purgar el aire de la autoclave.

### **Centrifuga**

Las siguientes son las características requeridas:

- Firme, sólida, libre de vibraciones durante su funcionamiento.
- Que alcance 3000 g manteniendo la temperatura por debajo de los 35 ° C (o que tenga sistema de refrigeración).
- Rotor con tapa de cierre hermético para contener aerosoles
- El rotor, la tapa del rotor, contenedores de tubos y adaptadores, todo, autoclavable.
- Contenedores de tubos con tapa
- La mayor capacidad posible para contener al menos tubos de 15 ml, y si es posible de 50 ml

- Con una traba de seguridad para impedir la apertura de la centrifuga mientras está en funcionamiento.
- Con detector de desbalance.

Las revoluciones por minuto (RPM) son una medida de la velocidad a la que gira el rotor. La eficiencia que tiene la centrifuga para sedimentar depende de esa velocidad y también de la longitud del radio del rotor. A esta eficiencia se la llama fuerza de centrifugación (RCF son las siglas en inglés). Se mide en múltiplos de la fuerza de gravedad (g).

Para sedimentar micobacterias con eficiencia aceptable se debe trabajar al menos a 3000 g.

Si se quiere calcular cual es la fuerza de centrifugación en g que se está alcanzando al trabajar a determinada velocidad expresada en RPM, se aplica la siguiente fórmula

$$\text{RCF} = 1,12 r (\text{RPM} / 1000)^2$$

Donde r es el radio (distancia entre el centro del rotor y la base del tubo)

Si se quiere calcular cuantas RPM se requieren para alcanzar una fuerza de 3000g, se aplica la siguiente fórmula

$$\text{RPM} = 1000 \sqrt{3000 / 1,12 r}$$

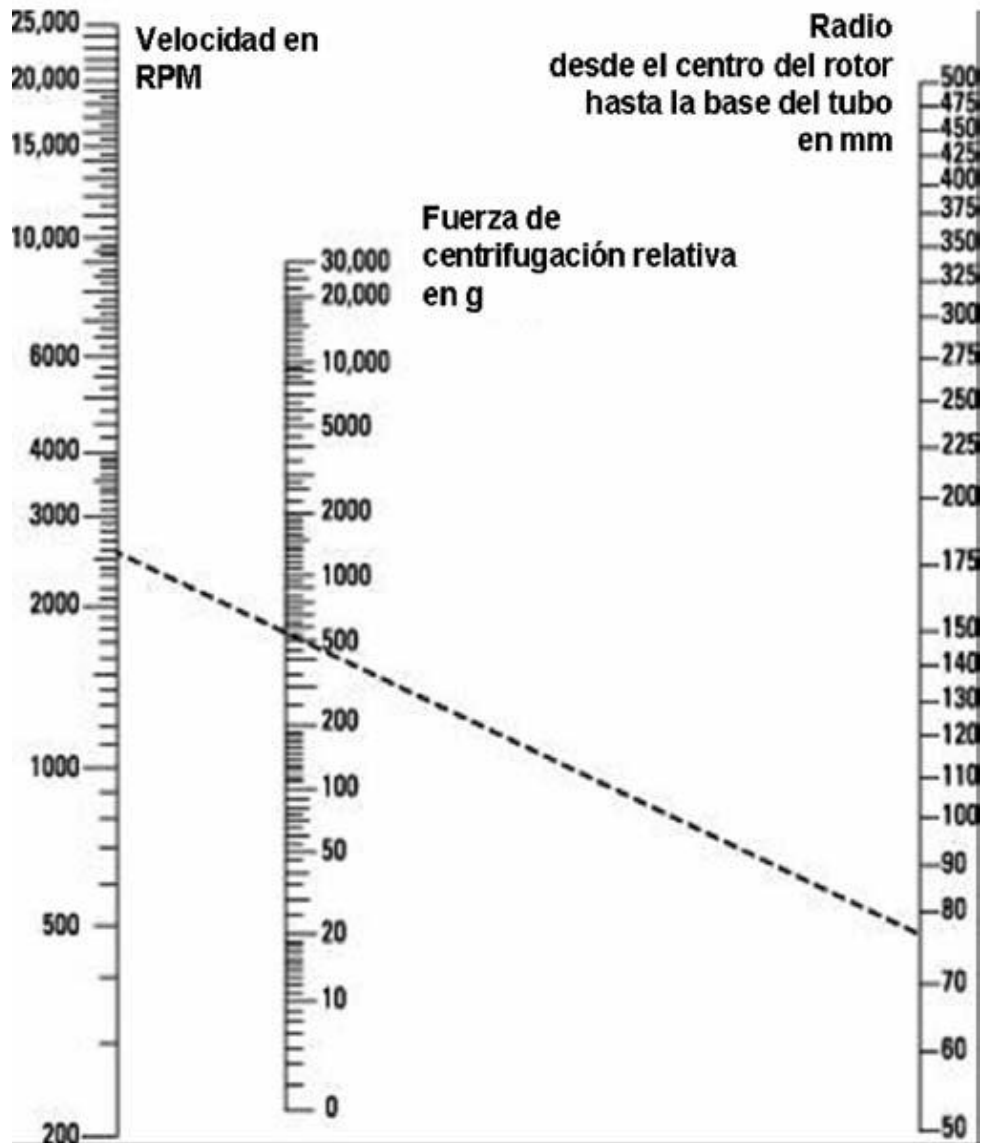
Para hacer estas conversiones se puede utilizar un nomograma que relaciona las escalas de estas tres variables:

RPM, radio y RFC. Uniendo con una línea los valores de dos de ellas, se obtiene el cálculo de la tercera en el punto de intersección de la línea trazada. A continuación se muestra un ejemplo.

Al centrifugar con un rotor que tiene un radio de 77 mm desde su centro hasta el punto donde está la base del tubo que se está utilizando, a una velocidad de 2600RPM, se alcanza una fuerza de centrifugación de sólo 500 g

Existen centrífugas que permiten trabajar a 3000 g pero incrementando su temperatura significativamente por encima de los 37 °C. Esto resulta en un efecto letal para el bacilo, mayor cuanto más alta sea la temperatura que alcance.

Muchas de la centrifugas en uso para el cultivo del bacilo de la tuberculosis no alcanzan la eficiencia adecuada, o calientan excesivamente las suspensiones, o son inseguras. En tal situación es necesario programar la renovación de las centrifugas para procurar que el cultivo rinda adecuadamente.



## Centrifugación

Procurar una centrifuga segura, como la descrita en este Manual, y tubos de plástico desechables. Si no es posible obtenerlos, optar por un método que prescindiera de la centrifugación

- Asegurar rigurosamente el equilibrio de los tubos colocados en forma opuesta dentro del rotor de la centrifuga. Es conveniente utilizar un tubo con igual volumen de etanol al 70% para equilibrar cada tubo que contiene una muestra. Utilizar tubos del mismo tipo y grosor.
- Respetar los límites de carga y velocidad de la centrifuga establecidas por el fabricante.
- Nunca abrir la centrifuga mientras está en funcionamiento.



- Abrir los contenedores de tubos de la centrifuga dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Dejar reposar los tubos al menos 5 minutos después de agitarlos con la mano, con vortex, o después de centrifugarlos, antes de abrirlos.
- Eliminar muy cuidadosamente los sobrenadantes, con una maniobra suave evitando salpicaduras, en un recipiente con tapa que contenga hipoclorito de sodio al 1% que pueda ser cerrado inmediatamente después de utilizado y luego autoclavado

### **Cabina de seguridad biológica**

No son recomendables las cabinas que no estén fabricadas por empresas certificadas, que aseguren sólida construcción del equipo, perfecto sellado de juntas, y alta eficiencia en la circulación y filtrado del aire.

Cabinas ineficientes pueden concentrar los aerosoles, permitir que filtren hacia el ambiente, y aun impulsarlos sobre el operador lo que, lejos de brindar seguridad, aumenta el riesgo.

Las cabinas que crean flujo laminar sólo para mantener estéril el área de trabajo, no son de seguridad biológica y no deben ser utilizadas como tales.

Pueden utilizarse cabinas de clase I o II. Las de clase I toman el aire del medio ambiente, lo impulsan, sin esterilizar, dentro de la cabina hacia el área de trabajo, de allí lo extraen, lo esterilizan por filtración, y lo devuelven al medio ambiente. Las de clase II son preferibles porque esterilizan el aire antes de impulsarlo dentro de la cabina, de manera que proveen atmósfera prácticamente libre de gérmenes al área de trabajo. En cabinas de clase II no son necesarios mecheros ni esterilizadores para operar, a menos que se utilicen asas metálicas. De hecho debe evitarse el uso de mecheros para aumentar la durabilidad de los filtros y evitar variaciones en el flujo de aire dentro de la cabina.

Para esterilizar el aire estos equipos tienen filtros de alta eficiencia HEPA que retienen partículas de 0,3  $\mu\text{m}$  o mayores, con una eficiencia de 99,99%, de esta manera atrapan microorganismos y esporas, además de las partículas ambientales

El sistema de impulso de aire hacia el interior de la cabina crea una barrera, llamada flujo laminar, que protege al operador de los aerosoles que pueden crearse, cuando atraviesa con sus manos la barrera y procesa el material por detrás de ella. Los indicadores exteriores del equipo permiten controlar el caudal de aire. El operador mira a través de un cristal ubicado al frente de la cabina, enmarcado en una ventana móvil que debe estar baja mientras se opera con material de riesgo biológico.

La cabina puede tener un ducto flexible que conduzca fuera del edificio el aire estéril que se devuelve al medio ambiente y un sistema que impida su retorno.

Según lo tenga o no las cabinas son clasificadas como tipo A o B respectivamente. Este ducto provee mayor seguridad para el caso en que se produzca algún accidente en el filtro de extracción, contribuye a crear presión negativa dentro del laboratorio y resulta conveniente cuando es necesario desinfectar la cabina para expulsar hacia el exterior vapores tóxicos.

Las cabinas deben tener

- Muy buena iluminación del área de trabajo; normalmente tienen también un tubo UV germicida, que no es indispensable pero si recomendable.
- Nivel de ruido menor a 55dBA cuando está en funcionamiento para no exponer al personal del área.
- Alarmas para evidenciar mal cierre de la ventana o alteraciones en el flujo laminar por cualquier desperfecto.

Es necesario el servicio técnico de personal capacitado para validar la instalación de la cabina y para verificar periódicamente su buen funcionamiento. La certificación es hecha en forma anual pero cuando comienzan a saturarse los filtros puede ser hecha por un periodo de seis meses. A medida que se saturan los filtros es posible aumentar el caudal del aire para vencer la mayor resistencia hasta el momento en que es necesario el cambio de filtros. Si se deja la cabina en funcionamiento cuando no se está trabajando en ella se contribuye a crear presión negativa del aire en un laboratorio pequeño, pero a la vez, como filtra polvo ambiental, se están consumiendo horas de vida útil de los filtros.

Es conveniente tener siempre en reserva un juego de filtros, para que puedan ser reemplazados en el momento en que sea necesario sin interrumpir en forma prolongada la rutina de trabajo.

La verificación debe ser realizada de acuerdo a las normas nacionales e internacionales vigentes. Debe incluir pruebas de integridad de la cámara, fuga de los filtros HEPA, velocidad del flujo de aire descendente y en la abertura frontal, tasa de presión negativa y de buen funcionamiento de interruptores y alarmas. También pueden realizarse pruebas de intensidad de iluminación, luz ultravioleta, ruidos y vibraciones.

El servicio técnico debe adherir a la vista en el equipo el comprobante de la certificación y la fecha en la que debe repetirse la verificación, lo que dependerá del uso que tenga la cabina y del resultado de las mediciones.

### **Incinerador de asas**

Permite esterilizar, dentro de la cabina de seguridad biológica, las asas de alambre de nicron, puntas de pinzas y otros instrumentos metálicos delgados dentro de un tubo de vidrio o cerámica que es calentado a alta temperatura por un sistema eléctrico. De esta forma las partículas producidas al calentar el metal en el mechero quedan contenidas dentro del tubo hasta incinerarse. Se evita además el

uso de llama dentro de la cabina que puede variar la dirección del flujo de aire por cambios de temperatura.

Conviene contar con un repuesto del tubo de reserva para el caso en que haya que reemplazarlo

### **Agitador de tubos tipo *Vortex***

Es ubicado dentro de la cabina de seguridad biológica, y utilizado para lograr mejor homogenización durante el tratamiento de las muestras, sobre todo de esputo.

### **Estufa de incubación**

El cultivo del bacilo de la tuberculosis requiere un gran espacio para la incubación. Se debe tener en cuenta que los tubos deben permanecer en la estufa hasta dos meses y se van acumulando cada día de trabajo. Es conveniente contar con el modelo más grande posible que pueda ser ubicado dentro del laboratorio y cuyo costo pueda ser solventado.

Se deben tomar todas las precauciones para mantener la temperatura entre 35 y 37 °C uniforme y constante en toda la estufa. Las estufas de gran tamaño requieren circulación de aire forzado para mantener la uniformidad de la temperatura. Es necesario asegurar el buen funcionamiento del ventilador que distribuye el aire, cambiar los burletes de la puerta cuando han perdido integridad, no abrir la puerta innecesariamente durante la jornada de trabajo, principalmente cuando se trabaja en un cuarto estufa. Es conveniente que la estufa tenga doble termostato de manera que si falla uno funcione el segundo y se evite pérdida de material cultivado. La estufa debe tener un termómetro exacto de temperatura mínima y máxima.

Se debe tener expuesto cerca de su puerta el registro diario de la temperatura mínima y máxima.

La limpieza de la estufa debe ser mantenida por el personal entrenado del laboratorio.

### **Baño María o bloque de calentamiento**

Se requiere un baño maría pequeño o un bloque de calentamiento que asegure incubación a temperatura constante hasta 100°C, con una precisión de 0,1°C en caso de realizar la prueba de catalasa a 68°C.

### **Termómetros**

Son necesarios, en el rango de 0 a 100°C, con una precisión de 0,1°C, preferentemente calibrados. Son utilizados para controlar la temperatura en el

interior de la estufa de incubación (son necesarios 4 para una cámara estufa), coagulador, refrigeradores y baño María o bloque de calentamiento.

Son muy convenientes los termómetros que permiten introducir una sonda en el interior del equipo y pueden ser adheridos en el exterior para controlar la temperatura sin abrirlo, y los que marcan la temperatura máxima y mínima alcanzada por el equipo.