



**ORGANISMO ANDINO DE SALUD - CONVENIO HIPÓLITO UNANUE**  
**PROGRAMA "FORTALECIMIENTO DE LA RED DE LABORATORIOS**  
**DE TUBERCULOSIS EN LA REGIÓN DE LAS AMÉRICAS"**

# MANUAL

**PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO**  
**DE LA TUBERCULOSIS**

**PARTE 1: Manual de actualización de la Baciloscopia**



**PARTE 1:**  
**Manual de actualización de la Baciloscopia**

**MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. PARTE 1: MANUAL DE ACTUALIZACIÓN DE LA BACILOSCOPIA/** Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas” -- Lima: ORAS - CONHU; 2018.

88 p.; ilus, tab.

DIAGNÓSTICO/ TUBERCULOSIS/ LABORATORIOS/BACILOSCOPIA

Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú No. 2018-16693

**MANUAL PARA EL DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS. PARTE 1: MANUAL DE ACTUALIZACIÓN DE LA BACILOSCOPIA**

**Coordinación Técnica**

María Susana Imaz. Laboratorio de Tuberculosis, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias E. Coni, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Centro Colaborador OPS/OMS, Santa Fe, Argentina.

**Revisión técnica**

Claudia Bäcker, Susana Balandrano. Laboratorio de Micobacterias, InDRE, Laboratorio Supranacional, Ciudad de México, México.

Lucía Barrera. Asesora independiente.

Ernesto Montoro. Coordinador Laboratorios de Tuberculosis OPS/OMS, WDC.

**Consultor**

Eddy Valencia Torres. Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias, INS. Lima, Perú.

**Primera Edición del Manual de Baciloscopía, 2008**

María Delfina Sequeira. Laboratorio de Tuberculosis, INER E. Coni, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Centro Colaborador OPS/OMS, Santa Fe, Argentina.

Lucía Barrera. Servicio de Micobacterias, INEI, ANLIS Dr C Malbrán, Laboratorio Supranacional, Buenos Aires, Argentina.

**Fotografías**

Gonzalo Márquez. Laboratorio de Tuberculosis, INER E. Coni, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Centro Colaborador OPS/OMS, Santa Fe, Argentina.

**ORGANISMO ANDINO DE SALUD – CONVENIO HIPÓLITO UNANUE, 2018**

Av. Paseo de la República N° 3832, Lima 27 – Perú

Tel.: (00 51-1) 422-6862 / 611 3700

<http://www.orasconhu.org>

[contacto@conhu.org.pe](mailto:contacto@conhu.org.pe)

Tiraje: 500 ejemplares

Imprenta: Diseñarte, S.A de C.V.

Segunda Edición, octubre 2018

---

Esta publicación se enmarca dentro de la ejecución del Programa “Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas” que tiene como Receptor Principal al Organismo Andino de Salud – Convenio Hipólito Unanue (ORAS - CONHU); y como Subreceptores a la Secretaría Ejecutiva del Consejo de Ministros de Salud de Centroamérica y República Dominicana (SE COMISCA) y a la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS).

El contenido de este documento puede ser reseñado, resumido o traducido, total o parcialmente sin autorización previa, con la condición de citar específicamente la fuente y no ser usado con fines comerciales.

Derechos reservados conforme a Ley.



<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	11
<b>INTRODUCCIÓN</b>	12
<b>LA MUESTRA</b>	15
<b>EI ESPUTO</b>	15
<b>El envase</b>	15
<b>Número de muestras y momento de la recolección</b>	16
Para diagnóstico	16
Para control de tratamiento	16
Para organizar la internación de pacientes	17
<b>Obtención espontánea del esputo</b>	17
<b>Calidad de la muestra</b>	17
Métodos especiales para obtener muestras de esputo	18
Inducción de esputo	18
Lavado gástrico	19
Lavado bronquial	20
<b>OTRAS MUESTRAS</b>	20
<b>Orina</b>	21
<b>Líquido cefalorraquídeo</b>	21
<b>Líquidos pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros</b>	21

<b>Biopsias y material resecado</b>	<b>21</b>
<b>Pus</b>	<b>22</b>
<b>Sangre</b>	<b>22</b>
<b>RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS</b>	<b>23</b>
<b>Recepción de los pacientes</b>	<b>23</b>
<b>Conservación</b>	<b>24</b>
<b>Transporte</b>	<b>24</b>
<b>Recepción en el laboratorio que hace la baciloscopia</b>	<b>25</b>
<b>LA BACILOSCOPIA</b>	<b>29</b>
<b>LUGAR DE TRABAJO Y MATERIALES</b>	<b>30</b>
<b>PREPARACIÓN Y FIJACIÓN DEL EXTENDIDO</b>	<b>32</b>
<b>TINCIÓN</b>	<b>36</b>
<b>La técnica de Ziehl Neelsen</b>	<b>36</b>
Coloración	36
Decoloración	37
Coloración de fondo	37
<b>Tinción fluorescente</b>	<b>39</b>
Coloración	39
Decoloración	39
Coloración de fondo	39
Tinción de fluorescencia en canasta de coloración	41
<b>OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y LECTURA DE EXTENDIDOS</b>	<b>43</b>
<b>Características morfológicas del bacilo de la tuberculosis</b>	<b>43</b>

<b>Lectura e informe de resultados de extendidos coloreados con Ziehl Neelsen</b>	<b>44</b>
<b>Lectura e informe de resultados de frotis coloreados con fluorocromos</b>	<b>49</b>
<b>REGISTRO E INFORMES DE RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>DECONTAMINACIÓN Y DESECHO DEL MATERIAL</b>	<b>53</b>
<b>SISTEMAS DE REGISTROS</b>	<b>56</b>
<b>ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LAS BACILOSCOPIAS</b>	<b>57</b>
<b>CONTROL DE CALIDAD INTERNO</b>	<b>57</b>
<b>Control de colorantes, coloración y microscopio</b>	<b>59</b>
<i>Preparación de los controles positivos no teñidos</i>	<b>59</b>
<i>Preparación de los controles negativos no teñidos</i>	<b>59</b>
<i>Control de calidad de cada nuevo lote de colorantes</i>	<b>60</b>
<i>Control de calidad de colorantes en uso/coloración</i>	<b>60</b>
<b>Control de registros e informes</b>	<b>60</b>
<b>Monitoreo de indicadores de desempeño</b>	<b>61</b>
<b>EVALUACIÓN EXTERNA DE CALIDAD</b>	<b>63</b>
<b>Método de relectura de láminas</b>	<b>63</b>
<b>Pruebas de eficiencia</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO I. NORMAS MÍNIMAS DE BIOSEGURIDAD</b>	<b>66</b>
Información y control médico del personal del laboratorio	<b>66</b>
Precauciones generales de trabajo	<b>67</b>
Precauciones en la toma y manipulación de las muestras	<b>68</b>



Manipulación y uso de desinfectantes	69
Manipulación de otras sustancias químicas	70
Procedimientos frente a un accidente de trabajo	70
<b>ANEXO II: PREPARACIÓN DE REACTIVOS</b>	<b>71</b>
PARA LA TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN	71
PARA LA TINCIÓN FLUORESCENTE	72
PRECAUCIONES CON LOS COLORANTES	74
CUIDADO Y MANTENIMIENTO DE LA BALANZA	74
CÁLCULO DE STOCK DE REACTIVOS	75
<b>ANEXO III: MICROSCOPIO</b>	<b>77</b>
<b>MICROSCOPIA MEDIANTE LA COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN</b>	<b>77</b>
Componentes del microscopio óptico	77
Parte mecánica	77
Elementos ópticos e iluminación	78
Centrado de la iluminación (Iluminación de Kohler)	78
Enfoque del microscopio óptico	79
<b>MICROSCOPIA MEDIANTE COLORACIÓN FLUORESCENTE</b>	<b>80</b>
Enfoque del microscopio	80
<b>CUIDADOS GENERALES DE LOS MICROSCOPIOS</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO IV: MODELOS DE FORMULARIOS</b>	<b>82</b>
Formularios de solicitud de análisis de TB en muestras biológicas	82
Razón de Análisis	84
Resultado de la microscopía (para ser completado en el laboratorio)	84

Registro de laboratorio para baciloscopia y Xpert MTB/RIF	<b>86</b>
Planilla de control de reactivos de coloración	<b>89</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BAAR</b>	Bacilo ácido-alcohol resistente
<b>ID</b>	Indicadores de desempeño
<b>LED</b>	De las siglas en inglés Light Emitting Diode
<b>MF</b>	Microscopía de fluorescencia
<b>PNT</b>	Programa Nacional de Tuberculosis
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>SR</b>	Sintomático Respiratorio
<b>TB-MR</b>	Tuberculosis multirresistente
<b>TB-RR</b>	Tuberculosis resistente a rifampicina
<b>LA UNION</b>	Unión Internacional de Control de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>ZN</b>	Ziehl Neelsen

## INTRODUCCIÓN

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



***Cuanto mayor es el número de enfermos que están expectorando bacilos en la comunidad, mayor es la diseminación de la tuberculosis.***

***La identificación de los casos infecciosos es el principio de la solución para el problema de los enfermos y, fundamentalmente, para un problema de salud pública.***

No todas las personas infectadas (tuberculosis latente) enferman, sólo una de cada diez aproximadamente, que son las más susceptibles. La tuberculosis puede manifestarse en cualquier órgano, porque el *Mycobacterium tuberculosis* se disemina por todo el organismo; sin embargo, la enfermedad pulmonar es la más infectante y frecuente (80-85% de todos los casos diagnosticados) debido a que el bacilo necesita abundante oxígeno para desarrollarse. En los ápices de los pulmones se desarrollan cavidades en las que se alojan grandes poblaciones de bacilos, que cuando son expectorados pueden ser detectados en muestras de esputos.

**Los síntomas** más característicos de la tuberculosis pulmonar **son la tos y la expectoración que persisten por 2 semanas o más. A las personas con estos síntomas se les denomina Sintomáticos Respiratorios (SR).** Otras manifestaciones pueden ser pérdida de peso, sudores nocturnos y dolor de tórax.

El diagnóstico de certeza de tuberculosis puede hacerse en forma confiable en el laboratorio demostrando la presencia de bacilos en una muestra de la lesión por medio de la baciloscopia (examen microscópico), el cultivo o una prueba molecular rápida (como el ensayo Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/ Ultra RIF o el TB-LAMP).

Para que la baciloscopia sea positiva es preciso que la muestra tenga como mínimo, entre 5.000 y 10.000 bacilos por mililitro de muestra. Este alto contenido de bacilos se encuentra en los pacientes con tuberculosis pulmonar, especialmente en aquellos cuya lesión es severa,

con cavitación. Estos pacientes son los que mayores posibilidades tienen de transmitir los bacilos manteniendo la enfermedad en la comunidad. La baciloscopia, sin embargo, presenta sensibilidad limitada para el diagnóstico de la enfermedad extrapulmonar y en ciertos grupos de pacientes, como los niños y las personas que viven con VIH. Nuevas herramientas diagnósticas recomendadas por la OMS durante los últimos 10 años (como el cultivo en medio líquido y las pruebas rápidas moleculares como el Xpert MTB/RIF o el Xpert MTB/ Ultra RIF) permiten mejorar las posibilidades de detectar el bacilo.

La baciloscopia no es específica para *M. tuberculosis*, sino que revela la presencia de bacilos del género *Mycobacterium*, sean del complejo *Mycobacterium tuberculosis* o micobacterias ambientales. Estas últimas pueden causar enfermedad sólo en determinadas situaciones; la mayoría de las veces se hallan como colonizantes o contaminantes.

Los Programas Nacionales de Tuberculosis (PNT) tienen como objetivo principal cortar la cadena de transmisión, diagnosticando tempranamente los casos infectantes y tratándolos con esquemas eficaces que pueden lograr una curación cercana al 100%.

***En muchos países la baciloscopia continúa siendo la primera prueba diagnóstica utilizada en grupos de pacientes sospechosos de TB no priorizados para el empleo de los métodos rápidos moleculares. Es simple, económica y eficiente para detectar los casos infecciosos***

Es necesario contar con suficientes laboratorios que aseguren a los enfermos un diagnóstico rápido, preciso y accesible.

Los servicios de laboratorio son más eficientes y potentes cuando se integran en una Red Nacional de Laboratorios de Tuberculosis que debe involucrar a laboratorios del sistema de salud pública de todas

las jurisdicciones incluyendo además, a los que prestan servicios a prisiones, a los del sistema de seguro de salud, a los del sistema de salud privado y a los de organizaciones no gubernamentales.

La conducción de esta red debe estar integrada en el nivel de programación y decisión del PNT, el que a su vez, debe hacer las gestiones necesarias para sostener la organización y el funcionamiento de esta red.

Todos los componentes de la red tienen responsabilidad y se complementan para asegurar el acceso al diagnóstico rápido y confiable por baciloscopia. Todas las unidades de salud deben recibir muestras de los SR que deben ser investigados. Los laboratorios de centros de atención primaria de la salud deben realizar la baciloscopia e integrarse a los programas de aseguramiento de la calidad. Los laboratorios intermedios agregan entre sus responsabilidades la de entrenar al personal de los laboratorios de su jurisdicción y la de asegurar en ellos la calidad de la baciloscopia. Los laboratorios centrales o de referencia nacional deben ser capaces de organizar el programa de aseguramiento de la calidad en todo el país, mantener bajo evaluación la oferta y realización de baciloscopias, proveer herramientas para el entrenamiento del personal de laboratorio de todos los niveles, planificar y gestionar el suministro de los insumos cuya adquisición centralizada sea conveniente. El resto de los componentes del PNT debe sumarse utilizando adecuadamente la oferta de baciloscopias y los resultados producidos por la red de laboratorios.

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

La estandarización de los procedimientos involucrados en la baciloscopia se basa en normas técnicas que son el producto de amplia experiencia,

periódicamente revisada por organizaciones internacionales como la Organización Panamericana de la Salud (OPS)/ Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (LA UNION).

El primer Manual de Microscopía de Tuberculosis puesto en vigencia por OPS para Latinoamérica fue escrito por el Dr. Luis Herrera Malmsten, Jefe del Departamento Tuberculosis del Instituto Bacteriológico de Chile, revisado y aprobado por un Comité Asesor en Bacteriología de Tuberculosis y publicado como documento CD/TB- ST/LAB en 1973. Ese Manual fue utilizado hasta que, en 1983 un Comité Asesor de la OPS/OMS, actualizó las normas en la Nota Técnica CEPANZO (OPS/OMS) N° 26. El comité estuvo integrado por los Dres. Lamberto Blancarte del Laboratorio Central de Tuberculosis de México, Omar Latini del Instituto Nacional de Epidemiología de Argentina, Adalbert Laszlo del Centro de Control de Enfermedades de Canadá y Pedro Valenzuela del Instituto de Salud Pública de Chile y trabajó bajo la coordinación de los Dres. Isabel N. de Kantor y Álvaro Yáñez de la Organización Panamericana de la Salud.

En 2008, dicho manual fue actualizado, incorporándose fundamentalmente elementos y herramientas para garantizar la calidad de los resultados y mejorar la seguridad de las personas y el medio ambiente. En los últimos años, sin embargo, las recientes recomendaciones en relación a la bioseguridad de los laboratorios de tuberculosis, así como el advenimiento de nuevos métodos diagnósticos, especialmente en lo relativo a la microscopía de fluorescencia con lámpara LED, han obligado a actualizar el presente manual.

## LA MUESTRA

Para que el laboratorio pueda obtener resultados confiables no sólo es necesario que ejecute las técnicas en forma correcta. Necesita recibir una buena muestra, entendiéndose por tal, la que:

- proviene del sitio de la lesión que se investiga,
- fue obtenida en cantidad suficiente,
- fue colocada en un envase adecuado y limpio,
- se encuentra bien identificada,
- fue adecuadamente conservada y transportada.

La muestra más examinada es el esputo debido a que, como se ha dicho, la tuberculosis pulmonar es la más frecuente. Sin embargo, dado que la enfermedad puede manifestarse en cualquier órgano, con menor frecuencia puede requerirse la investigación de muestras muy variadas: orina, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, líquido ascítico, sangre, pus de cavidades abiertas, biopsias, entre otras. Estas muestras de lesiones extrapulmonares deben procesarse también por cultivo y/o (para algunos tipos de muestras, especialmente líquido cefalorraquídeo y biopsias) mediante una prueba rápida molecular (como el Xpert MTB/RIF o el Xpert MTB/ Ultra RIF), según lo establezcan las políticas nacionales.

## EL ESPUTO

### • El envase

El envase más adecuado debe tener las siguientes características:

- **Boca ancha:** de no menos de 50 mm de diámetro,
- **Capacidad entre 30 ml y 50 ml,** para que el paciente pueda depositar la expectoración con facilidad dentro del envase, sin ensuciar sus manos o las paredes del frasco y para que en el laboratorio se pueda seleccionar y tomar la partícula más adecuada para realizar el extendido,
- **Cierre hermético:** con tapa a rosca, para evitar derrames durante el transporte y la producción de aerosoles cuando se abre el envase en el laboratorio. Las tapas a presión generan mayor riesgo de formación de aerosoles y salpicaduras en el momento de ser retiradas,



- **Material plástico transparente, resistente a roturas**, para poder observar la calidad de la muestra cuando la entrega el SR, evitar roturas y derrames de material infeccioso y facilitar su eliminación. No se recomienda lavar y reutilizar frascos de vidrio, para evitar posibles errores originados en la transferencia de material de una muestra a otra y minimizar la manipulación de material potencialmente infeccioso.

### Número de muestras y momento de la recolección

#### *Para diagnóstico*

Como la eliminación de los bacilos por el esputo no es constante, es conveniente analizar más de una muestra de cada SR para el diagnóstico de la tuberculosis. La primera muestra detecta aproximadamente el 80% de los casos positivos, la segunda agrega un 15% y la tercera un 5% más. Por cuestiones técnicas y operativas, los organismos internacionales recomiendan la obtención de dos muestras por SR.

La **primera muestra** debe ser tomada **siempre** en el **momento de la consulta** (muestra inmediata), cuando el médico u otro personal del equipo de salud identifican al SR. **La segunda** la debe recolectar el paciente en su casa **por la mañana al despertar** (muestra matinal). La obtención de la muestra del momento de la consulta asegura que se pueda realizar al menos una baciloscopia del SR. Sin embargo, es más probable que se eliminen bacilos en las muestras matinales, por lo que deben hacerse los mayores esfuerzos para que la persona regrese con otra muestra.

#### *Para control de tratamiento*

El tratamiento estándar de la tuberculosis comprende dos fases: una inicial intensiva que dura entre 2 y 3 meses y otra de consolidación que dura de 4 a 7 meses, dependiendo del esquema adoptado.

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

Para aquellos pacientes que inician un esquema de tratamiento clásico de 6 meses, se aconseja examinar por baciloscopia una muestra al final de la fase intensiva de tratamiento, durante el quinto mes y al final del tratamiento. Si la baciloscopia del segundo mes o posteriormente resultara positiva, la muestra será enviada para cultivo para el caso en que se requiera prueba de sensibilidad. Es importante recalcar, que el uso de pruebas moleculares rápidas, como el Xpert MTB/RIF no es apropiado para el monitoreo del tratamiento debido a que estas pruebas detectan ADN residual de bacilos no viables. Sin embargo, el Xpert MTB/RIF puede ser útil para detectar resistencia a rifampicina en un paciente que continua baciloscopia positiva al segundo mes o posteriormente.

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

Los pacientes en tratamiento por tuberculosis multirresistente (TB-MR) o tuberculosis resistente a rifampicina (TB-RR) deben ser monitoreados por baciloscopia y cultivo. Si los recursos lo permiten, se recomienda la realización de un



cultivo mensual a lo largo de todo el tratamiento.

#### *Para organizar la internación de los pacientes*

Para evitar la transmisión de tuberculosis intrahospitalaria el paciente bacilífero que, excepcionalmente, requiera ser internado, deberá permanecer en aislamiento hasta que la baciloscopia de tres muestras de esputo tomadas en días sucesivos resulte negativa.

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

Para la recolección de las muestras se deben tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Elegir un lugar bien ventilado y que ofrezca intimidad para que el SR produzca la expectoración. Puede ser una habitación bien ventilada y con acceso a luz natural (sol) o algún lugar abierto no concurrido del patio del Servicio de Salud. No utilizar lugares cerrados o muy concurridos tales como laboratorios, consultorios médicos, salas de espera o baños, porque éste es el proceso más riesgoso entre todos los necesarios para realizar la baciloscopia.



- Entregar al SR el envase de recolección ya rotulado con su nombre o número de identificación y, de ser posible, el servicio que solicita la baciloscopia. Estos datos **deben ser escritos en la pared del frasco** y no en la tapa para evitar errores, utilizando rótulos que no se despeguen o con lápiz indeleble.

- Solicitar al SR una buena muestra de esputo utilizando la palabra que lo identifica en cada lugar (gallo, pollo, gargajo, del fondo del pecho, etc.), instruyéndolo con lenguaje simple y comprensible para que:

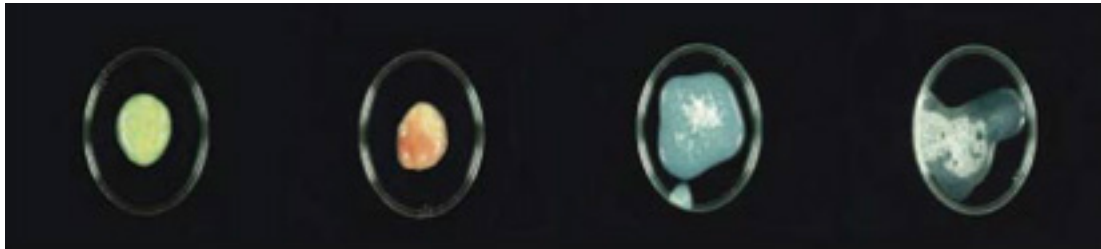
- inspire profundamente llenando sus pulmones de aire tanto como sea posible
- retenga el aire un momento
- expulse luego la expectoración con un esfuerzo de tos, tratando de arrastrar las secreciones del árbol bronquial
- recoja el esputo producido dentro del envase tratando de que entre en su totalidad,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



### Calidad de la muestra

La muestra de esputo mucopurulento proveniente del árbol bronquial es la que asegura mayor probabilidad de que se puedan observar bacilos.

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



**Mucopurulenta**

**Sanguinolenta**

**Mucosa**

**Salivosa**

## Métodos especiales para obtener muestras de esputo

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

### Inducción de esputo

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

Realizar el procedimiento en la sala de toma de muestras u otra con buena ventilación (es muy recomendable realizar el procedimiento en una habitación con luz ultravioleta –apagada cuando se realiza el procedimiento- y sistema de ventilación mecánica):

- Usar mascarillas de bioseguridad desechables (respiradores N95)
- Nebulizar durante 15 minutos con solución fisiológica, a temperatura apenas superior a la corporal.
- Para facilitar la expulsión de la expectoración, puede ser conveniente acostar al paciente boca abajo con la almohada debajo del tórax y la cabeza por fuera de la camilla y más baja, y si es posible, masajeando con técnicas fisioterapéuticas.
- Se puede repetir el proceso hasta tres veces.
- Recoger la primera expectoración producida.
- Entregar un segundo frasco para que la persona recoja las secreciones producidas en las 24 horas siguientes.

- Descartar las máscaras
- Esterilizar el material empleado y luego lavarlo con detergente y abundante agua.

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

Aunque no sea mucoso, el material recolectado debe ser examinado por baciloscopia y cultivo, y mediante una prueba molecular rápida (como el Xpert MTB/RIF o el Xpert MTB/ Ultra RIF), según lo establezcan las políticas nacionales.

## Lavado gástrico

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

La obtención de la muestra debe ser realizada por un médico o personal de enfermería experimentado. Para evitar demoras en el procesamiento, la toma de muestra debe ser programada en conjunto con el personal del laboratorio.

Se recomienda utilizar esta muestra sólo para diagnóstico y no en el control del tratamiento. Se deben respetar las siguientes recomendaciones:

**Número de muestras:** al menos tres.

**Envase:** el aconsejado para esputo.

**Momento de la recolección:** por la mañana al despertar, en ayunas dado que la ingesta de alimentos hace que la expectoración ingerida pase al intestino. El ayuno no debe ser demasiado prolongado y no debe haber estímulo alimenticio que aumente la acidez gástrica (por ej. por presencia de la madre ante los lactantes).

**Técnica:** Se introduce una sonda de longitud y diámetro adecuados a la edad del paciente hasta el estómago. Una vez que la sonda llega al estómago, se aspira con jeringa muy suavemente el contenido gástrico (usualmente 3-5 ml) para que la succión no provoque daño. En caso de no obtenerse material, se inoculan 10 a 15 ml de agua destilada o solución fisiológica estéril y se recoge el contenido gástrico inmediatamente después, en un frasco de tamaño adecuado. Para neutralizar la acidez del contenido gástrico y de ese modo, prevenir la destrucción del bacilo, es recomendable adicionar igual volumen de solución de bicarbonato de sodio (8%) a la muestra recolectada.

**Conservación:** El material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio (en una caja refrigerada), ya que debe ser cultivado durante las 4 horas siguientes a su obtención. Si excepcionalmente, no es posible el procesamiento inmediato debe conservarse en heladera por no más de 24 horas.

**Procesamiento:** Debido al sufrimiento que causa el procedimiento en un niño y al bajo rendimiento de la baciloscopia en esta población, esta metodología debería ser realizada sólo cuando, además de la baciloscopia, estén disponibles otras técnicas más sensibles como el cultivo o eventualmente pruebas

rápidas moleculares (como el Xpert MTB/RIF o el Xpert MTB/ Ultra RIF). Se recomienda programar con el laboratorio el/los día/s asignados para la toma de muestra de modo que asegure el procesamiento inmediato o tan rápido como sea posible para el cultivo. La baciloscopia se realiza con el sedimento de la muestra centrifugada previamente durante 15 minutos a 3.000g, por lo que es conveniente que sea hecha en el laboratorio que cultiva la muestra.

## Lavado bronquial

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

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

- Tomar la muestra en una sala bien ventilada y utilizando mascarillas de bioseguridad.
- Utilizar un fibrobroncoscopio esterilizado no más de 15 días antes.
- Entregar al paciente un frasco para que la recoja toda la expectoración que por estímulo de la fibrobroncoscopia puede producirse en las 24 horas siguientes.
- Esterilizar rigurosamente el fibrobroncoscopio con glutaraldehído al 2% activado con una sustancia bicarbonatada, según las indicaciones del proveedor.
- Después de la esterilización, lavar el fibrobroncoscopio enérgicamente para desprender bacilos muertos que puedan haber quedado adheridos

Si el fibrobroncoscopio no es debidamente esterilizado, puede ser vehículo de transmisión de tuberculosis. Si, además, no es apropiadamente

lavado después de la esterilización, también puede originar falsos resultados positivos en las muestras que se tomen subsecuentemente, por la presencia de bacilos remanentes, vivos o muertos.

El material debe ser conservado a 2-8°C y debe ser enviado al laboratorio (en una caja refrigerada), en lo posible dentro del mismo día de la obtención de la muestra. Este material debe ser cultivado y/o procesado por una técnica molecular rápida (como el Xpert MTB/RIF o el Xpert MTB/ Ultra RIF) para asegurar el mejor rendimiento posible de esta muestra de difícil obtención. Para confirmar la presencia de bacilos viables en el caso de tener un resultado positivo de la baciloscopia es necesario cultivar esta muestra.

## OTRAS MUESTRAS

Todas las muestras extrapulmonares deben ser encauzadas para cultivo y eventualmente procesadas mediante otra técnica más sensible que la baciloscopia como lo son los ensayos moleculares Xpert MTB/RIF y Xpert MTB/ Ultra RIF, la que ha sido recomendada para la identificación rápida de TB en muestras de líquido cefalorraquídeo y biopsias. Esta recomendación obedece a la escasa cantidad de bacilos de la tuberculosis presente que sólo podrá ser detectada por pruebas más sensibles que la baciloscopia. Adicionalmente, en otros casos, es necesario el uso del cultivo, para confirmar o descartar que la muestra contenga micobacterias ambientales saprófitas (como en el caso de la orina que resulta con baciloscopia positiva) o, excepcionalmente patógenas.

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

riego que tienen los procesos de concentración/homogeneización de las muestras de producir aerosoles, los mismos deben ser realizados dentro de una Cabina de Seguridad Biológica.

## Orina

**Número de muestras:** mínimo tres y máximo seis.

**Cantidad y momento de recolección:** previa higiene externa con agua, el paciente debe recoger no menos de 50 ml de la primera micción de la mañana desechando la primera parte para disminuir la carga de gérmenes contaminantes.

**Envase:** de 300-500 ml, limpio y de boca suficientemente ancha para posibilitar la recolección directa.

**Conservación:** la muestra debe ser procesada inmediatamente porque el pH ácido afecta la viabilidad del bacilo. Si se debe transportar hasta otro laboratorio, se recomienda enviar el sedimento de toda la orina centrifugada durante 15 minutos a 3.000g, neutralizado con 1 mg de bicarbonato de sodio o fosfato trisódico anhidro y, si es necesario, conservado entre 2 y 8°C por no más de 12 horas hasta el momento del envío.

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

## Líquido ceforraquídeo

La obtención de este material está reservada a personal médico. Se debe tener en cuenta los siguientes detalles:

**Cantidad de muestras:** todas las que el médico crea conveniente; cuanto mayor es la cantidad

de muestras procesadas y mayor el volumen de muestra procesado, mayor es la posibilidad de hallazgo de bacilos.

**Envase:** estéril de 10-15 ml de capacidad y con tapa a rosca de cierre hermético.

**Uso de anticoagulante:** no es necesario

**Conservación:** cuando la muestra va a ser procesada por cultivo, es conveniente procesar el material inmediatamente o conservado a 2-8°C por no más de 12 horas. Para su utilización en el sistema Xpert MTB/RIF o el Xpert MTB/ Ultra RIF, si bien la conservación de este tipo de muestra por un tiempo más prolongado no afectaría su rendimiento, se recomienda procesarla lo antes posible y en caso que sea necesario conservarla, mantenerla a 2-8°C (el máximo tiempo de conservación antes de su procesamiento es de 7 días).

## Líquidos pleural, ascítico, pericárdico, articular y otros

La obtención de estos materiales está reservada al personal médico. Se debe tener en cuenta los siguientes detalles:

**Número de muestras:** todas las que el médico considere conveniente

**Envase:** estéril, de capacidad adecuada para la cantidad de la muestra

**Uso de anticoagulante:** puede extraerse mediante el uso de una jeringa heparinizada o, eventualmente, luego de extraído el líquido en una jeringa, puede colocarse en un recipiente estéril y agregarse dos gotas de citrato de sodio al 10% o de oxalato de potasio al 10% por cada 10 ml de muestra.

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

## Biopsias y material resecado

La obtención de estos materiales está reservada al personal médico.

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

**Envase:** estéril

**Conservantes:** uno o dos mililitros de solución fisiológica o agua destilada estéril para evitar la desecación. No agregar formol para el estudio bacteriológico porque es letal para el bacilo; la porción de la muestra reservada para el estudio histopatológico debe ser separada para ser preservada en formol al 10%.

**Conservación:** refrigerado, el material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio que hará el cultivo o ser conservado refrigerado, y al abrigo de la luz hasta su envío. Para su utilización en el sistema Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/Ultra RIF, si bien la conservación de este tipo de muestra por un tiempo más prolongado no afectaría su rendimiento, se recomienda procesarla lo antes posible y en caso que sea necesario conservarla, mantenerla a 2-8°C (el máximo tiempo de conservación antes de su procesamiento es de 7 días).

## Pus

**Envase:** estéril, es preferible no usar hisopos para evitar la desecación. En caso de utilizarlos, antes de la toma de muestra deben ser humedecidos con solución fisiológica o agua destilada estéril.

**Conservación:** en refrigerador. La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio que hace el cultivo o ser conservado refrigerado, y al abrigo de la luz hasta su envío.

## Sangre

La investigación de sangre está indicada para pacientes con inmunosupresión severa, como en casos con infección por VIH con bajo recuento de linfocitos totales o CD4, y con baciloscopias de muestras respiratorias reiteradamente negativas. Se debe tener en cuenta los siguientes detalles:

**Cantidad y momento de recolección:** dos muestras de 10 ml de sangre venosa en días consecutivos.

**Esterilidad y bioseguridad:** utilizar guantes, desinfectar previamente la piel del área donde se efectuará la extracción con alcohol iodado.

**Anticoagulantes:** utilizar jeringas con heparina (no emplear EDTA).

**Envase:** transferir la sangre a un tubo plástico seco estéril con tapa a rosca de cierre hermético.

**Conservación:** Si no puede ser enviada la muestra inmediatamente al laboratorio que la procesará, colocar la sangre recién extraída en un frasco-ampolla conteniendo 50 ml de medio de cultivo para sangre (caldo cerebro-corazón (BHI) con anticoagulante). Incubar a 37°C hasta el momento del envío al laboratorio.

## RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

### Recepción de los pacientes

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

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

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

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

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



- Si el paciente no obtuvo esputo y devuelve el envase, también ubicar el envase dentro de la caja para que luego sea desechado con el material contaminado como si hubiera sido usado.
- Después de recibida la muestra es necesario agilizar los procedimientos en todo lo posible. Cuanto antes se procese, mayor será la posibilidad de encontrar en ella *M. tuberculosis* por baciloscopia o cultivo.

La temperatura ambiente y el transcurso del tiempo favorecen la multiplicación de los gérmenes habituales del árbol respiratorio y de la boca que desnaturalizan las proteínas del esputo, lo que dificultará la elección de la partícula útil y favorecerá la destrucción del bacilo.

La multiplicación de la flora habitual o contaminante del esputo aumenta la posibilidad de que el cultivo resulte contaminado.

## Conservación

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

**Si las muestras van a ser procesadas sólo por baciloscopia y deben inevitablemente ser conservadas por varios días,** se puede agregar unas 10 gotas de fenol al 5 % en el día en que se reciben, tapar el envase y mezclar 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 o auramina.

Si las muestras van a ser procesadas por cultivo, las mismas deben ser conservadas a 2-8°C hasta 7 días, aunque de preferencia deberían ser procesadas dentro de los 3 días, para evitar la contaminación de los cultivos.

## Transporte

En un **Servicio de Salud que no tiene laboratorio,** el personal debe conocer **a qué laboratorio debe enviar las muestras, con qué frecuencia y por cuál medio de transporte.**

Tanto para baciloscopia como para el cultivo o prueba molecular rápida es recomendable que el transporte sea hecho, por lo menos, dos veces por semana. De ser posible, se debe establecer los días de la semana en 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 avisado previamente.



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

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

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

Cada envío debe ser acompañado por las hojas de solicitud de examen correspondiente y una lista con los de datos de los pacientes: nombre y apellido, servicio, aclaración sobre si es muestra para diagnóstico (1ª, 2ª) o para control de tratamiento indicando el mes. Estos formularios y listados deben estar en un sobre o bolsa de nylon, separado de los envases con muestras.

Se debe verificar que la dirección del laboratorio al cual se envía la caja sea la correcta, que el número de envases corresponda con el del listado y el n° de formularios de solicitud, que la identificación de cada envase coincida con la del listado y los formularios de solicitud y que en el listado conste claramente la fecha de despacho y el nombre y dirección del centro de salud que lo envía.

## Recepción en el laboratorio que hace la baciloscopia

El personal del laboratorio que recibe las muestras debe:

- Colocarse guantes desechables
- Abrir la caja sobre la mesada dedicada exclusivamente para este fin.
- Inspeccionar las muestras controlando si se han producido derrames.
- Desinfectar el exterior de los envases con algodón con fenol al 5% o hipoclorito de sodio al 1% si se han producido pequeños derrames durante el transporte. Si el derrame ha sido masivo esterilizar toda la caja en autoclave o incinerarla.
- Comprobar que las muestras estén bien identificadas.



- Desinfectar la caja con hipoclorito de sodio al 1%.
- Descartar los guantes desechables
- Lavarse las manos luego de quitarse los guantes.
- Anotar los datos de cada paciente, el tipo y calidad de la muestra recibida, el objetivo del estudio (diagnóstico o control de tratamiento) en el Registro de laboratorio.



- Notificar al servicio que derivó las muestras, en caso de ser necesario, los inconvenientes que se hayan observado, especialmente en la calidad y cantidad de los esputos y en la forma de envío.

Las causas para el rechazo de una muestra son:

Que el envase esté roto o la muestra volcada, que la identificación de la muestra en el frasco no coincida con la de las solicitudes de estudios bacteriológicos, que el frasco recolector no tenga identificación, que la muestra haya sido recogida en forma inadecuada (por ejemplo en un papel)

- Si el laboratorio que recibe las muestras no realiza cultivo y/o pruebas moleculares (como el Xpert MTB/RIF, Xpert MTB/Ultra RIF o los sistemas de hibridación en tiras), deberá tener establecida la conexión con el laboratorio de referencia que sí lo realice, y organizado el transporte regular.
- La detección de la tuberculosis sensible y resistente, requiere del uso de algoritmos diagnósticos que tengan en cuenta los grupos de mayor riesgo de manera de asegurar el uso eficiente de los recursos diagnósticos. Tales algoritmos son específicos para cada país, y dependiendo de los mismos las muestras biológicas serán encauzadas para cultivo y/o pruebas moleculares rápidas. En la tabla se detallan las recomendaciones genéricas de utilización de estas pruebas sobre muestras biológicas. Dependiendo del algoritmo diagnóstico establecido, un mismo paciente podría ser estudiado por una o más de estas técnicas.

Prueba/ procedimiento	Descripción	Muestras a encauzar
<p><b>Cultivo</b></p>	<p>Medio sólido</p> <p>Sistemas automatizados con medios líquidos comerciales</p>	<p><b>Muestras para diagnóstico:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• de pacientes con síntomas respiratorios persistentes y dos o más muestras anteriores con baciloscopia negativa</li> <li>• de pacientes con sospecha de TB extrapulmonar</li> <li>• de niños</li> <li>• de inmunosuprimidos particularmente VIH positivos</li> <li>• de pacientes con antecedente de tratamiento antituberculoso, especialmente si se registró pérdida en el seguimiento o fracaso</li> <li>• de pacientes con exposición a infección por bacilos resistentes a las drogas (contactos de casos con tuberculosis resistentes, internados o trabajadores de instituciones de salud o de prisiones donde se registran casos con tuberculosis resistente)</li> <li>• de lavado gástrico y lavado bronquioalveolar</li> </ul> <p><b>Muestras para control de tratamiento:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• con baciloscopia positiva al finalizar el segundo mes de quimioterapia o en un control posterior</li> <li>• casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento</li> </ul>
<p><b>Métodos moleculares</b></p>	<p>Sistemas de hibridación en tiras que permiten identificar que los bacilos presentes en la muestra corresponden a complejo <i>M. tuberculosis</i> y estudiar la resistencia a rifampicina (solamente o en combinación con isoniacida)</p>	<p><b>Muestras de diagnóstico con baciloscopia positiva provenientes de:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• pacientes que están a mayor riesgo de tener TB resistente (pacientes con antecedentes de tratamiento antituberculoso o exposición a infección por bacilos resistentes a las drogas),</li> <li>• pacientes con TB que viven con VIH.</li> </ul>

Prueba/ procedimiento	Descripción	Muestras a encauzar
<p><b>Métodos moleculares</b></p>		<p><b>Muestras baciloscopia positiva recibidas para control de tratamiento (sólo para detectar la aparición de resistencia a rifampicina - sola o en combinación con isoniacida):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• con baciloscopia positiva en el control del segundo mes de quimioterapia o en un control posterior</li> <li>• casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento</li> </ul>
	<p>Sistemas de hibridación en tiras que permitan identificar resistencia a fluoroquinolonas y drogas inyectables de segunda línea en pacientes ya identificados como MR o RR</p>	<p><b>Muestras de esputo con baciloscopia positiva/negativa provenientes de pacientes identificados como MR/RR</b></p>
	<p>Ensayo Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/ Ultra RIF que permite identificar la presencia del complejo <i>M. tuberculosis</i> y evalúa la resistencia a Rifampicina</p>	<p><b>Muestras de diagnóstico</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• muestras respiratorias de pacientes que están a mayor riesgo de tener TB resistente (pacientes con antecedentes de tratamiento antituberculoso o exposición a infección por bacilos resistentes a las drogas) y asociada a infección VIH.</li> <li>• muestras de líquido cefalorraquídeo y biopsias provenientes de pacientes con sospecha de TB extrapulmonar</li> </ul> <p><b>Muestras baciloscopia positiva recibidas para control de tratamiento (sólo para investigar la sensibilidad a la rifampicina)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• en el control del segundo mes de quimioterapia o en un control posterior</li> <li>• casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento</li> </ul>

---

## LA BACILOSCOPIA

La técnica se basa en la ácido-alcohol resistencia, que es la propiedad que tienen las micobacterias de unir en su pared fucsina fenicada o auramina y retenerlas frente a la acción de decolorantes como la mezcla de ácido y alcohol. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente a los ácidos micólicos, que poseen las micobacterias en la pared celular. Así, utilizando una técnica adecuada es posible reconocer a los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en la muestra del enfermo como un bastoncito rojo fucsia o fluorescente sobre una coloración de fondo que facilita su visualización.

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

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

La coloración de Ziehl-Neelsen (ZN) ha sido la técnica más empleada para el diagnóstico de tuberculosis en los países de América Latina durante los últimos 100 años. Comparado con la microscopía de fluorescencia (MF), la microscopía convencional tiene como ventaja que requiere un entrenamiento más sencillo, ya que la capacidad de identificar el bacilo por esta metodología es más fácil de adquirir.

En 2011, la OMS recomendó el uso de la MF con lámpara LED. La MF es al menos 10% más sensible que la microscopía de ZN. Además, la utilización de esta técnica agiliza el trabajo ya que el tiempo de lectura del extendido se reduce casi a la mitad. Comparado con la MF convencional (con lámpara de mercurio), la MF con lámpara LED ofrece considerables ventajas, ya que no requiere de un cuarto totalmente oscuro para la lectura de los extendidos y la lámpara LED tiene importantes ventajas operativas sobre la lámpara de mercurio tradicional, porque tiene una elevada vida útil, no genera calor y no tiene los riesgos de contaminación del ambiente en caso de rotura. Para poder realizarla con calidad aceptable se debe contar con personal entrenado en la lectura de extendidos teñidos con auramina. Dado que reduce el tiempo necesario para la realización de la lectura y requiere personal adiestrado, está especialmente recomendado para laboratorios con alta carga de trabajo.

## LUGAR DE TRABAJO Y MATERIALES

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

Es recomendable que el área de trabajo sea exclusiva, pero no siempre es posible. Si se debe compartir un área del laboratorio, es necesario escoger un sitio exclusivo para la preparación de extendidos, preferentemente alejado de la entrada, para evitar corrientes de aire y movimiento de personal alrededor durante el procesamiento de las muestras. También es muy recomendable realizar los extendidos y coloraciones en un horario especial, en el momento de menor trabajo en el laboratorio.

Los requisitos mínimos del laboratorio son:

- Buena iluminación.
- Ventilación natural (a través de ventanas) o mecánica (mediante un extractor de aire) que permita renovar el aire del laboratorio. Si se decide emplear un equipo de extracción de aire, éste deberá contar con un caudal aproximado de 6 a 12 cambios del volumen de aire del laboratorio por hora y si se trata de un extractor de pared, éste debe contar con una salida al exterior hacia un área poco transitada del servicio y a una altura de al menos dos metros y medio del piso. Aunque la ventilación natural se considera aceptable, se prefiere la ventilación mecánica, ya que asegura la unidireccionalidad del flujo de aire. En todos los casos, se debe asegurar que la corriente del aire no esté dirigida a la mesada en la que se preparan los extendidos.
- Los equipos de aire acondicionado deben ser colocados correctamente considerando la dirección del flujo de aire, y siempre debe asegurarse que la corriente de aire no esté dirigida a la mesada en la que se preparan los extendidos.
- Paredes pintadas, sin descascaramientos y pisos lavables, que puedan ser desinfectados con solución de hipoclorito de sodio.
- Una mesa o mesada para colocar las muestras que se reciban y realizar los extendidos, con dimensiones mínimas de 1 x 0,50 m, en lo posible cubierta con material liso y resistente a soluciones germicidas (fórmica, acero inoxidable, cerámica o azulejos con juntas mínimas, o materiales similares). En caso de no contar con este tipo de mesada se puede utilizar bandejas o cubrir la mesa con un vidrio o papel.
- Un lavabo con alguna fuente y desagote de agua, en el que se pueda lavar las manos y realizar la tinción.
- Una repisa o armario para los reactivos, portaobjetos y demás materiales.
- Una mesa para el microscopio, cerca de una ventana si no hubiera luz eléctrica durante todo el día.
- Una mesa para escribir los informes y los registros del laboratorio.
- Un armario para almacenar los frotis.



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

- Dos batas o guardapolvos de uso exclusivo para cada persona que realice baciloscopia.
- Microscopio con objetivo de inmersión en buenas condiciones, con una lámpara de repuesto. En el caso de realizarse la técnica de coloración con fluorocromos se necesita además un microscopio de fluorescencia LED o un microscopio óptico con un adaptador que permita transformarlo en un microscopio de fluorescencia LED con objetivos de 20x y 40x.
- Envases para recolección de muestras.
- Aplicadores de madera o caña/bambú.
- Láminas portaobjetos nuevas, limpiadas con alcohol y secadas al aire.
- Frascos color ámbar para soluciones colorantes.
- Un soporte para sostener 12 láminas portaobjetos durante la preparación de extendidos.
- Varillas de vidrio u otro soporte inoxidable, de dimensiones adecuadas para sostener 12 láminas portaobjetos durante la tinción.
- Un mechero, preferentemente de gas aunque puede utilizarse uno de alcohol
- Lápiz marcador de vidrio: graso o de tinta indeleble (que no sea de color rojo para evitar errores), con punta de diamante, de los que se utilizan para marcar cerámicas.
- Papel de filtro.
- Papel para limpieza de lentes, pueden ser pañuelos de papel desechables.
- Una pinza.
- Un hisopo.
- Un recipiente para descartar los envases con muestras, con tapa, de material que puedan ser desinfectado con solución de hipoclorito de sodio o que contenga una bolsa para residuos patológicos.
- Etanol al 70%
- Aceite de inmersión: se recomienda no utilizar aceite de cedro, sino aceites a base de hidrocarburos sintéticos o de polímeros con índice de refracción >1,5 debido a que no se secan, no se endurecen y no son disolventes de la fucsina.
- Soluciones desinfectantes:
  - fenol al 5%.
  - hipoclorito de sodio al 1%.

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

Si recibe reactivos y colorantes en cantidades necesarias para preparar un volumen determinado, requiere recipientes de vidrio para hacer la

preparación.

Si en cambio, debe preparar reactivos y colorantes requiere:

- Una balanza.
- Recipientes de vidrio aforados para preparar las soluciones.
- Un embudo.
- Sustancias químicas con calidad para análisis (Ver Anexo II)

## PREPARACIÓN Y FIJACIÓN DEL EXTENDIDO

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

- Lavarse las manos.
- Colocarse la bata o guardapolvo y guantes desechables.
- Ubicar en la mesada de superficie lisa, bandeja o papel embebido en hipoclorito de sodio al 1% sólo lo necesario para realizar el extendido:
  - mechero,
  - aplicadores,
  - soporte para los extendidos,
  - lápiz para marcar láminas portaobjetos,
  - láminas portaobjetos nuevas, previamente sumergidas en alcohol y secadas al aire,
  - no más de 12 envases con las muestras.
- Ubicar al lado de la mesa el recipiente para descartar el material con tapa.
- Ordenar las muestras y numerarlas con el número correspondiente al del Registro.

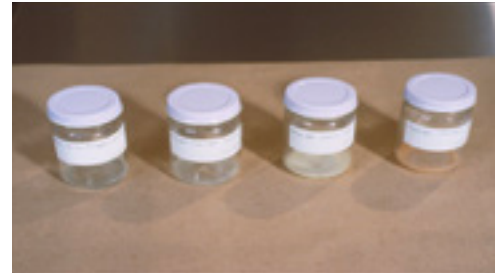


- Para cada muestra, numerar una lámina portaobjetos, siempre en el mismo borde. Debe ser el mismo número asignado en el Registro del laboratorio, en el formulario de la orden de examen y en las paredes del envase que contiene la muestra  
No tocar con los dedos la parte del portaobjetos destinada al extendido
- Disponer las muestras a la izquierda del operador, o a la derecha, siempre en la misma posición, en orden creciente de numeración. Ubicar cada lámina marcada delante de la muestra que le corresponde.
- Usar una lámina para cada muestra. No colocar extendidos de más de una muestra en una lámina.



- Si las muestras estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases durante 20 minutos antes de comenzar a abrirlos.

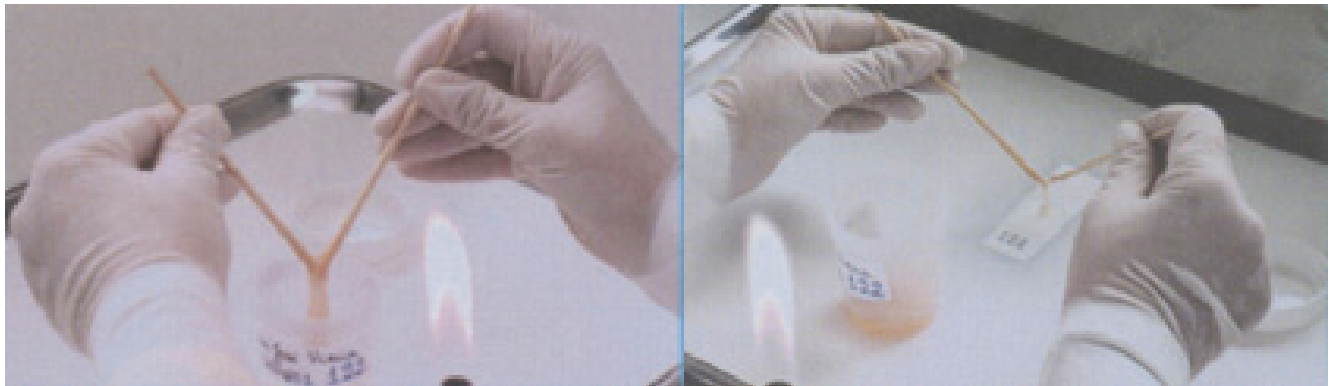
- Tomar la primera muestra y la lámina correspondiente y colocarlas detrás del mechero de manera que la llama quede entre el operador y el frasco. Esta posición protegerá al laboratorista de posibles formaciones de aerosoles al abrir el frasco.



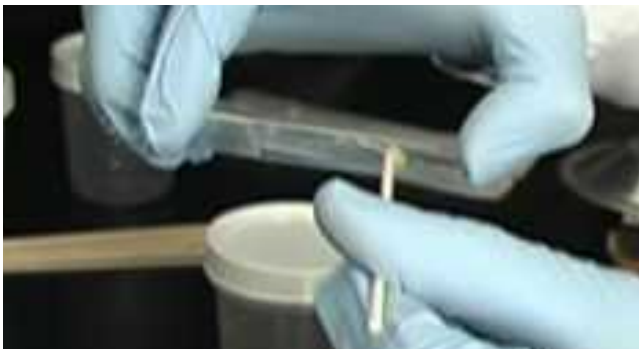
- Destapar con cuidado el envase para evitar la formación de aerosoles.

- Partir un aplicador en dos, tratando de que las puntas queden ásperas.

- Tomar cada parte del aplicador entre el pulgar y el índice de cada mano y con los extremos irregulares de cada trozo **seleccionar la partícula más densa o purulenta de la muestra de esputo** y enrollarla en una de los dos partes del aplicador con la ayuda de la otra. Si la muestra contiene varias porciones mucopurulentas tratar de mezclarlas con movimientos muy suaves del palillo y luego tomar una porción de la mezcla. Si sólo hay pequeñas partículas purulentas, escoger tres o más y mezclarlas en el mismo portaobjetos para homogeneizarlas.



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



Colocar la(s) partícula(s) seleccionada(s) sobre el portaobjetos y extenderla(s) con el aplicador con movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un óvalo de 2 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.

Verificar que el extendido tenga grosor homogéneo y adecuado. Si es demasiado fino, es posible producir un resultado falso negativo. Si es muy grueso, el material puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos debajo de una capa gruesa de mucus.

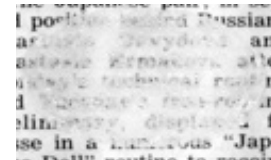
Se puede adquirir entrenamiento poniendo a una distancia de 10 cm un papel impreso debajo del extendido. El grosor adecuado es el que permite ver pero no leer un texto impreso a través del preparado. Una vez adquirido el entrenamiento, es preferible no repetir rutinariamente este proceso para evitar tocar y transferir muestras con los papeles impresos.



Bueno



Demasiado Grueso



Bueno



Demasiado Fino

- Dejar el extendido en un soporte ubicado al costado de la mesada para que se seque a temperatura ambiente. **El extendido no debe ser calentado a la llama mientras esté húmedo** pues el calor fuerte altera la estructura de los bacilos y su posterior tinción; además puede generar aerosoles.
- Desechar el aplicador en un recipiente de descarte; éste luego irá al autoclave o directamente a incineración.
- Cerrar el envase de la muestra con la que se realizó el extendido y dejarlo en el lado opuesto al lugar donde están los frascos con las muestras que aún no se han procesado, para evitar confusiones.
- Continuar de la misma manera con cada una de las muestras siguientes.
- Conservar las muestras hasta terminar las lecturas de la baciloscopia y verificar que no es necesario realizar nuevos extendidos o enviarlas para cultivo o pruebas moleculares.

- Limpiar la superficie de trabajo con una toalla de papel o algodón empapado en hipoclorito de sodio al 1% para desinfectarla.
- Descartar los guantes, del mismo modo que las muestras
- Esperar a que las láminas se hayan secado al aire.
- Tomar de a uno cada extendido con una pinza manteniendo la cara que contiene la muestra hacia arriba, y pasarlos rápidamente sobre la llama de un mechero tres o cuatro veces cuidando que no se caliente demasiado, ya que el sobrecalentamiento puede dañar la pared del bacilo.



- Colocar cada lámina fijada en un soporte que puede ser el soporte que se va a utilizar para la coloración.

***Los extendidos deben ser coloreados lo antes posible, ya que algunos bacilos permanecen vivos después de fijados con calor hasta que incorporan la fucsina.***

## TINCIÓN

### La técnica con Ziehl Neelsen (ZN)

#### Colorante:

Fucsina fenicada al 0,3%

#### Decolorante:

Acido clorhídrico al 3% en alcohol etílico o ácido sulfúrico al 25%

#### Colorante de contraste:

Azul de metileno al 0,1%

### Coloración

Disponer dos varillas de vidrio en forma paralela, a una distancia de aproximadamente 5 cm entre una y otra sobre un soporte dentro del lavabo/pileta de coloración.

Filtrar la cantidad de fucsina necesaria para las tinciones a realizar en la jornada. Si el número de baciloscopias a colorear es pequeño, se puede filtrar la fucsina directamente cuando se la deposita sobre el extendido a través de un pequeño embudo con papel de filtro.



- Colocar sobre el soporte las láminas fijadas conservando el orden numérico con el extendido hacia arriba y manteniendo una separación de al menos 1 cm entre ellas.
- Cubrir totalmente la superficie del extendido con fucsina fenicada recientemente filtrada. Dispensar el colorante con suavidad, sin salpicar y sin tocar con el gotero o con el embudo los extendidos
- Con la llama de un hisopo embebido en alcohol calentar suavemente por debajo de los extendidos con movimientos de vaivén hasta que observe que se desprenden los primeros vapores blancos. No calentar con mechero.
- En caso de derrame del colorante, reponer la fucsina, no dejar que el colorante se seque sobre el preparado.

- En el término de aproximadamente cinco minutos calentar tres veces hasta emisión de vapores; esto es suficiente para que la fucsina penetre adecuadamente en el bacilo y se fije a sus lípidos. Asegurarse mantener el colorante en caliente sobre los extendidos al menos 5 minutos. No hervir la fucsina porque la pared de los bacilos puede destruirse y colorearse mal.

- Con una pinza, levantar cuidadosamente la lámina portaobjetos desde el extremo más cercano al operador. Enjuagar con abundante agua a baja presión (de preferencia destilada o purificada), lavar muy suave (no salpicar al resto de los extendidos) y cuidadosamente la superficie eliminando totalmente la solución de fucsina. Girar el extendido y lavar con cuidado también la parte posterior.

**Nota:** De ser posible, utilizar agua destilada o purificada para los lavados. El agua del grifo puede contener micobacterias ambientales que pudieran adherirse a los extendidos y ponerse en evidencia durante la recoloración de las láminas realizada en el procedimiento de evaluación externa de calidad de las baciloscopias por relectura, lo que daría lugar a falsos resultados positivos.

## Decoloración.

- Cubrir la totalidad del extendido con solución decolorante y dejar actuar aproximadamente 3 minutos.

- Enjuagar con abundante agua (de preferencia, destilada o purificada) a baja presión (no salpicar al resto de los extendidos). Se considera decolorado cuando las partes más gruesas del extendido a lo sumo conservan un leve tinte rosado. Si se observan cúmulos rojos o coloración rosada intensa, volver a cubrir con solución decolorante, dejarla actuar entre uno y tres minutos y enjuagar nuevamente.

- Eliminar el exceso de agua inclinando el portaobjetos.

## Coloración de fondo

- Cubrir todo el extendido con solución de azul de metileno.

- Dejar actuar durante un minuto.

- Enjuagar las láminas en ambas caras con agua (de preferencia destilada o purificada) a baja presión (no salpicar al resto de los extendidos) y limpiar la parte inferior con un algodón si ha quedado coloreada.

- Observar si las láminas conservan la numeración clara y visible. Si no es así volver a numerarlas.

- Dejar secar las láminas a temperatura ambiente, apoyándolas en posición vertical en un soporte sobre un papel absorbente. No apoyar papel absorbente sobre el extendido.

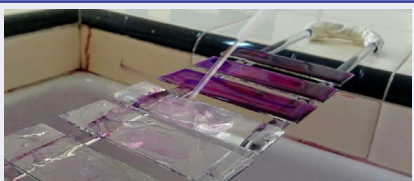
## TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN



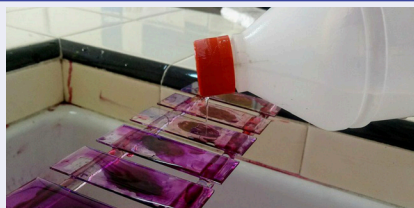
Cubrir con fucsina filtrada



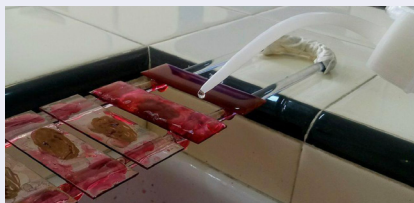
Calentar hasta emisión de vapores; tres veces durante 5 minutos (**asegurarse mantener el colorante en caliente sobre los extendidos al menos 5 minutos**).



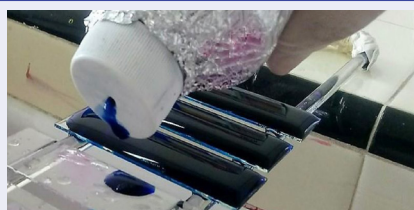
Lavar con agua (de preferencia destilada o purificada)



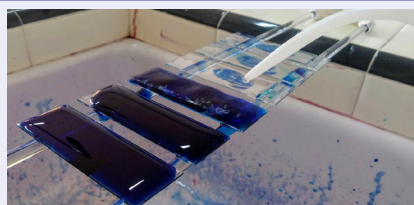
Cubrir con decolorante durante 3 minutos  
(Repetir este paso si es necesario)



Lavar con agua (de preferencia destilada o purificada)



Tinción de fondo con azul de metileno durante 1 minuto



Lavar con agua (de preferencia destilada o purificada)



Secar al aire

## Tinción fluorescente

### Colorante:

Auramina-O al 0,1%

### Decolorante:

Acido clorhídrico al 0,5% en alcohol etílico

### Colorante de contraste:

Permanganato de potasio al 0,5% o azul de metileno al 0,3%

Debido a que la adquisición de destreza para reconocer el bacilo por esta técnica requiere de un mayor grado de entrenamiento que el demandado en la técnica de ZN, la introducción de la técnica de fluorescencia en la red de laboratorios debe asegurar el reentrenamiento de su personal con énfasis en una formación práctica de moderada duración.

Cuando se realiza tinción de los extendidos con Auramina-O, los BAAR se ven como bastoncillos amarillos fluorescentes. Para observarlos la OMS recomienda el empleo de microscopios de fluorescencia con lámpara LED. Los extendidos son examinados con un objetivo de menor aumento (20x y 40x) que en la técnica de ZN (100x), lo que permite observar una superficie mucho mayor del frotis en menor tiempo.

## Coloración

- Evitar realizar extendidos gruesos. Ello puede interferir con una adecuada decoloración y la coloración de contraste puede enmascarar la presencia de BAAR.
- Colocar los extendidos numerados en un soporte de tinción en lotes de no más de 12 de la misma forma que para la coloración de ZN. Asegurarse que los extendidos queden nivelados.
- Filtrar la cantidad de Auramina-O necesaria para

las tinciones a realizar en la jornada. Si el número de baciloscopias a colorear es pequeño, se puede filtrar la Auramina-O directamente cuando se la deposita sobre el extendido a través de un pequeño embudo con papel de filtro.

- Cubrir los extendidos completamente con solución de Auramina-O y dejar actuar el colorante durante 20 minutos como mínimo, asegurándose que el mismo permanezca sobre el frotis. **No calentar.**
- Enjuagar con **agua destilada** (no salpicar al resto de los extendidos) y dejar escurrir inclinando el portaobjeto. No usar agua de grifo porque normalmente contiene cloro que puede interferir en la fluorescencia.

## Decoloración

- Decolorar con alcohol-ácido durante 1 ó 2 minutos. Se debe cuidar que la decoloración sea lo más completa posible.
- Enjuagar con abundante agua destilada a baja presión (no salpicar al resto de los extendidos). Si se observan cúmulos amarillos o coloración amarilla intensa, volver a cubrir con solución decolorante, dejarla actuar entre uno y dos minutos y enjuagar nuevamente.
- Inclinar cada extendido para escurrir el exceso de agua.

## Coloración de fondo

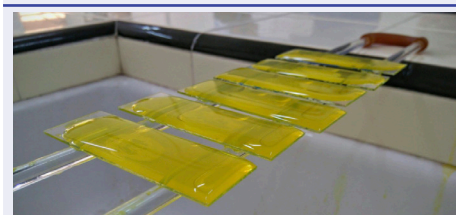
- Cubrir los extendidos con la solución de permanganato de potasio o azul de metileno y dejar actuar durante un minuto. Si se emplea permanganato de potasio, este tiempo es crítico, ya que si se deja mayor tiempo que el establecido la fluorescencia de los BAAR puede quedar enmascarada.
- Enjuagar con agua destilada y dejar escurrir inclinando los extendidos.

- Dejar secar los frotis al aire y al abrigo de la luz. No secar con papel de filtro.
- Observar si las láminas conservan la numeración clara y visible. Si no es así volver a numerarlas.
- Examinar al microscopio lo más pronto posible después de la tinción porque los BAAR pueden perder la fluorescencia, pero no antes de que los extendidos estén completamente secos.

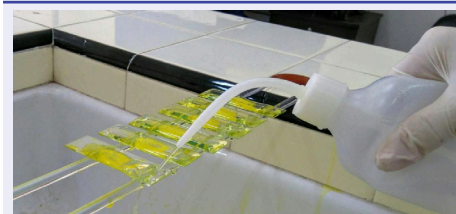
## TINCIÓN FLUORESCENTE



Cubrir con solución de Auramina-O 0,1% filtrada



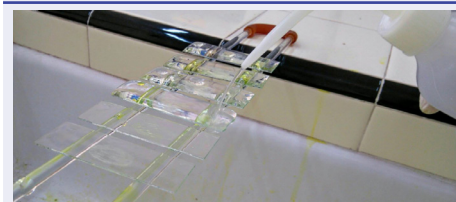
Dejar actuar durante un mínimo de 20 minutos (no calentar)



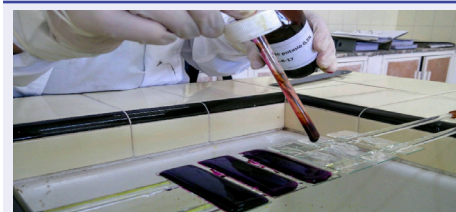
Lavar con agua destilada



Cubrir con decolorante durante 1 ó 2 minutos (Repetir este paso si es necesario)

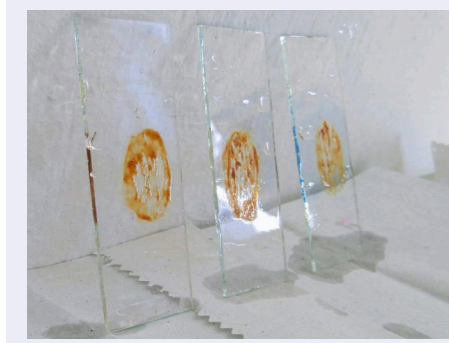


Lavar con agua destilada



Tinción de fondo con colorante de contraste (permanganato de potasio al 0,5% o azul de metileno al 0,3%) durante 1 minuto





Lavar con agua destilada y secar al aire y al abrigo de la luz

## Tinción de fluorescencia en canasta de coloración

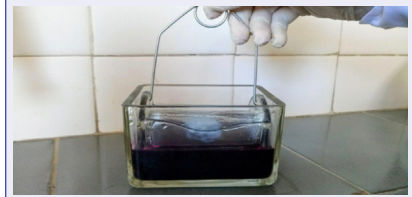
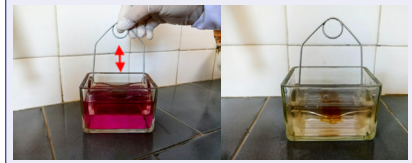

Este tipo de coloración debe ser considerada cuando el número de láminas a colorear diariamente es más de 10/día.

Se requiere contar con una canasta metálica/vidrio para extendidos y al menos 4 recipientes de vidrio adecuados para la canasta de coloración.



Para la coloración se deben seguir los siguientes pasos:

TINCIÓN FLUORESCENTE EN CANASTA DE COLORACIÓN	
	<p>Colocar las láminas en la canasta, ubicando la cara de todos los extendidos en la misma orientación.</p> <p>Colocar la canasta dentro del contenedor con Auramina-O y dejar un mínimo de 20 minutos. Asegurarse que el líquido cubra toda la laminilla.</p>
	<p>Llenar con agua destilada el recipiente correspondiente.</p> <p>Retirar la canasta de la Auramina-O y colocarla en el contenedor con agua. Suavemente mover la canasta hacia arriba y abajo (<math>\pm 1</math> cm) 2 o 3 veces (agitación suave).</p>
	<p>Retirar del agua destilada y colocar la canasta en el decolorante durante 2 minutos con agitación suave.</p>
	<p>Quitar el agua del recipiente correspondiente, enjuagar completamente y cargarlo nuevamente con agua destilada.</p> <p>Retirar la canasta del decolorante y colocarla en el contenedor con agua. Agitar suavemente.</p>

	<p>Remover la canasta del agua, y colocarla en la solución de contraste durante 1 minuto. Si se emplea permanganato de potasio, recordar que este tiempo es crítico, ya que si se deja mayor tiempo que el establecido, la fluorescencia de los BAAR puede quedar enmascarada</p>
	<p>Descartar el agua del contenedor correspondiente, enjuagar y cargarlo nuevamente con agua. Retirar la canasta de la solución de contraste y colocarla en el contenedor con agua. Agitar suavemente</p>
	<p>Retirar la canasta del agua, escurrir y dejar secar los extendidos al abrigo de la luz solar.</p>

La solución de Auramina-O, guardada con tapa en un armario al abrigo de la luz, puede ser usada durante 3 días. La solución de permanganato debe ser reemplazada diariamente, ya que su oxidación genera una coloración de fondo que hace la lectura más compleja.

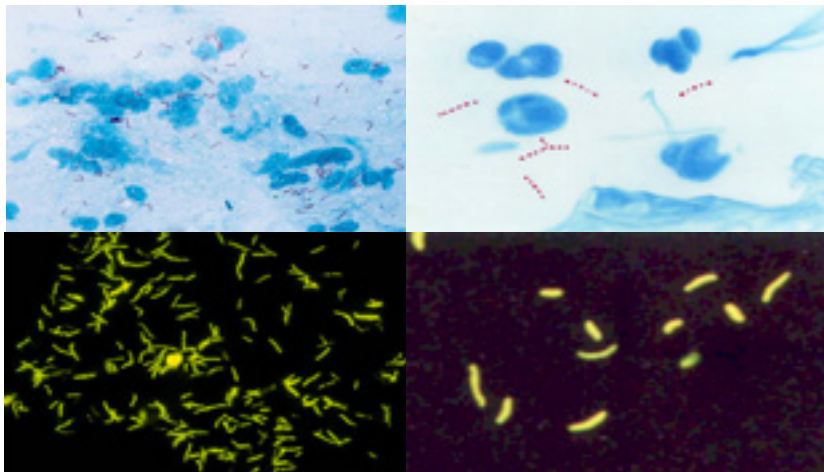
## OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y LECTURA DE EXTENDIDOS

La observación microscópica debe cumplir principalmente dos objetivos:

- determinar si en el extendido hay bacilos ácido-alcohol resistentes
- si los hay, cuantificar aproximadamente la riqueza en bacilos.

### Características morfológicas del bacilo de la tuberculosis

Los bacilos acidorresistentes tienen entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  de largo. Con la coloración de ZN se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, rojo fucsia destacándose claramente contra el fondo azul. En los extendidos teñidos con Auramina-O los bastoncitos se observan con fluorescencia amarilla (aunque con algunos sistemas de filtro pueden aparecer verdosos). 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 bacilococos.

Otros microorganismos pueden presentar distintos grados de ácidorresistencia, como *Rhodococcus spp.*, *Nocardia spp.*, *Legionella spp.* y los quistes de *Criptosporidio* e *Isospora spp.* Se observan como cocos, bacterias con formas variadas (pleomórficas), filamentos que a veces están cortados, o como esferas de gran tamaño si se las compara con las bacterias.

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

## Lectura e informe de resultados de extendidos coloreados con Ziehl Neelsen

Para la lectura, es necesario tomar en cuenta las siguientes indicaciones:

- Ubicar cerca del microscopio todos los elementos que se van a necesitar para la lectura:
  - aceite de inmersión
  - pañuelos o trozos de papel suave
  - el registro del laboratorio
  - una lapicera
  - una caja para guardar portaobjetos
- Depositar una gota de aceite de inmersión (con índice de refracción mayor a 1,5, ver nota) en un extremo del frotis, sin tocar el preparado con el gotero.

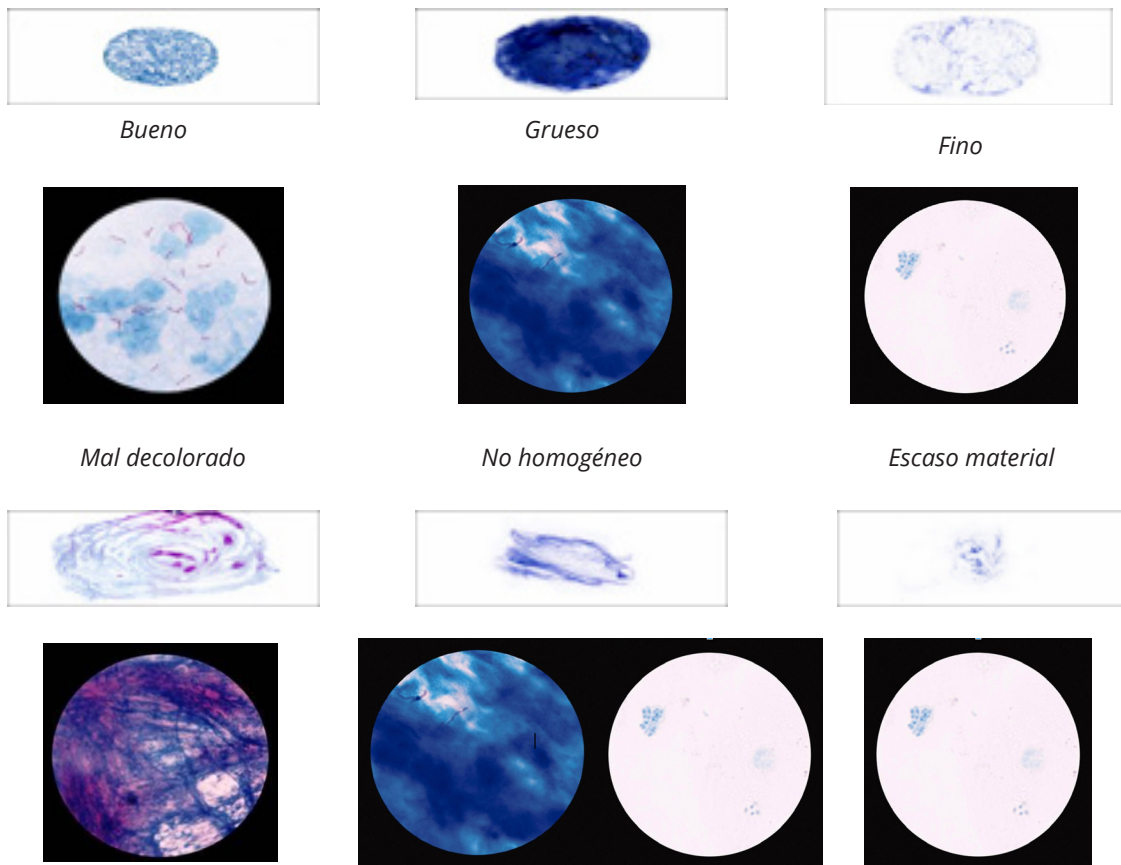


**Nota:** Para verificar que el índice de refracción del aceite de inmersión es mayor a 1,5 coloque una porción del aceite en un recipiente de vidrio. Si al introducir en el aceite una varilla de vidrio, ésta se torna invisible, implica que el índice de refracción del aceite es superior a 1,5.

- Usando el objetivo de 10x enfocar el extendido evitando la zona donde se depositó el aceite de inmersión. Explorar el extendido, buscando el material mucoso o mucopurulento.
- Cuidadosamente cambiar al objetivo de 100x y mover la platina hasta ubicarlo en la zona del portaobjeto en la que depositó el aceite de inmersión.
- Cuidadosamente ajustar el enfoque fino hasta que las células se vean nítidas
- Observar cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el micrométrico, antes de desplazarse al campo contiguo.
- Seguir un recorrido en líneas rectas, sistemático para recorrer el extendido evitando repetir la lectura de algunos campos. Ej: de izquierda a derecha:



- Observar la calidad del extendido y de la coloración. Si no fuesen buenas, repetir la baciloscopia de esa muestra.



**Si se observan anomalías, identificar las causas:**

- Si observa BAAR que se mueven en forma anormal, pueden ser bacilos provenientes de otra baciloscopia que fueron arrastrados por el aceite de inmersión y es necesario repetir la baciloscopia.

- Si se observan cuerpos extraños (artefactos) que se mueven cuando se desplaza el portaobjetos, pueden ser restos de alimentos, precipitados o cristales.

- Si sólo se mueven cuando se gira el ocular, se trata de suciedad que está en el ocular y hay que proceder a limpiarlo.

• Si no se mueven, la suciedad o bacilos contaminantes puede estar en los objetivos, el condensador, el espejo o la fuente de iluminación; proceder a limpiarlos.

• Contar el número de campos que ha leído y el número de BAAR que ha identificado. Se puede utilizar una cuadrícula de 10 cuadrados por 10 cuadrados, que representan los 100 campos microscópicos, como ayuda para registrar la cuenta. En cada cuadrado anotar el número de BAAR que se observa. Si no observa BAAR consignar 0.

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

- El número de campos a examinar depende de si se encuentran bacilos y en qué concentración:

Promedio de BAAR encontrados	Número mínimo de campos útiles a examinar
Ninguno	100
Menos de 1 por campo	100
1 a 10 por campo	50
Más de 10 por campo	20
De 1 a 4 en todo el extendido	200

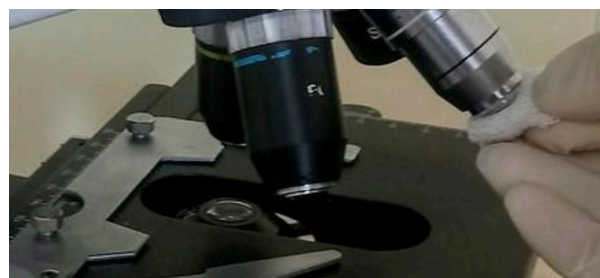
- Para calcular el promedio de BAAR encontrados por campo, sume el total de BAAR que ha contado y divídalo por el número total de campos que ha observado. Cuando los bacilos se presentan agrupados, una estimación aproximada del número de bacilos presentes en el cúmulo es suficiente para calcular este 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 teñidas de azul. Los campos sin estos elementos no deben ser considerados para contar el total de campos observados, a menos que contengan BAAR.

- Un microscopista experimentado completa la lectura de 100 campos en aproximadamente cinco minutos.

- Al finalizar la lectura, girar el revolver de los objetivos, retirar el portaobjetos de la platina, comprobar el número de identificación y registrar el resultado.

- Antes de examinar el portaobjetos siguiente, limpiar suavemente la lente de inmersión con un trozo de pañuelo de papel absorbente. Esto evita la transferencia de material al siguiente frotis que se va a leer.



*Procedimientos a seguir frente al hallazgo 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.
- Si la prueba Xpert MTB/RIF o Xpert MTB/Ultra RIF está disponible y los recursos lo permiten, procesar estas muestras por esta metodología. Adicionalmente, en caso de no contar con esta posibilidad, cultivar o enviar para cultivo estas muestras.

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

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

Problemas frecuentes

Problema	Causa	Solución
Extendido muy rosado	Insuficiente decoloración	Decolorar más tiempo
	Concentración del ácido muy baja	Verificar la preparación de los reactivos y los resultados del control de calidad
	La fucsina se ha secado sobre el portaobjetos	Verificar el volumen de fucsina colocado sobre el portaobjetos y que los extendidos estén nivelados en la bandeja de coloración
	Extendido muy grueso	Preparar un nuevo extendido
BAAR rosa pálido	Fucsina de calidad no adecuada (incluyendo las soluciones que se emplean fuera de la fecha de vencimiento o conservadas a la luz solar)	Verificar la preparación de los reactivos y los resultados del control de calidad  Controlar la fecha de caducidad de la fucsina y guardar en lugar oscuro.
	Fucsina insuficientemente o inadecuadamente calentada	Calentar la fucsina hasta vapores blancos (no hervir)
	Fucsina mantenida sobre el extendido por menos de 5 minutos en calor	Mantener el colorante primario al menos 5 minutos desde el primer calentamiento
	Extendidos sobrecalentados durante la fijación	Para fijar el extendido, pasar el mismo sobre la llama 3 veces, 1 o 2 segundos cada vez
Coloración de contraste muy oscura	Tiempo excesivo con el colorante de contraste	No exceder de 60 segundos
	Lavado inadecuado después de la coloración de contraste	Verificar que el lavado se realice cuidadosamente asegurando la eliminación de la solución de contraste
	Concentración del azul de metileno muy alta	Verificar la preparación de los reactivos y los resultados del control de calidad
	Extendido muy grueso	Preparar un nuevo extendido
Depósitos de material sobre la muestra al observar el extendido en el microscopio	Colorantes no filtrados o frascos donde se colocan los colorantes filtrados con precipitados de colorantes	Filtrar los colorantes y limpiar periódicamente los frascos de colorantes donde se colocan los mismos luego de la filtración diaria.
	Depósitos de material en la cara inferior de la lámina	Limpiar la cara inferior de la lámina con un papel suave luego de la coloración



## Lectura e informe de resultados de frotis coloreados con fluorocromos

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

- Examinar los extendidos coloreados con fluorocromos lo más pronto posible después de la tinción porque la fluorescencia se desvanece rápidamente; si no es posible leerlos inmediatamente deben guardarse a temperatura ambiente en un lugar oscuro, durante un lapso no mayor a 24 hs.
- Usar el objetivo de 20x para escanear el extendido y el de 40x para confirmar los objetos sospechosos. Este esquema de lectura es el que asegura el mayor rendimiento de la metodología. Sin embargo, existen en el mercado dispositivos que sólo permiten leer en una única magnificación (20x o 40x) por lo que los resultados de la cuantificación se presentan empleando ambas magnificaciones.
- Observar la calidad de la coloración. Si no fuese buena (ver Tabla de Problemas frecuentes más abajo), repetir la preparación del extendido y tinción de esa muestra.
- Se debe leer al menos una línea antes de reportar un resultado como negativo.
- No recolorar las láminas con escasos bacilos por ZN.
- Los extendidos pueden contener artefactos que fluorescen, pero no tienen la forma típica de un bacilo y a veces son de diferente color (generalmente más verdoso). Las formas bacilares verdosas o amarillas que no fluorescen no deben ser considerados como BAAR.

*Procedimientos a seguir frente al hallazgo de menos de 5 BAAR en una línea a una amplificación de 200x o menos de 3 BAAR en una línea a una amplificación de 400x.*

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

- Ampliar la lectura a otra línea del extendido y confirmar la observación mediante la lectura de otro técnico.
- 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 anterior, la muestra debe informarse como “Se requiere confirmación” solicitando una nueva muestra y consignando en el Libro de Registro el hallazgo.
- Si la prueba Xpert MTB/RIF está disponible y los recursos lo permiten, procesar estas muestras por esta metodología. Adicionalmente, en caso de no contar con esta posibilidad, cultivar o enviar para cultivo estas muestras.

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

<b>Resultado del examen microscópico a 200x</b>	<b>Resultado del examen microscópico a 400x</b>	<b>Informe</b>
No se encuentran BAAR en una línea	No se encuentran BAAR en una línea	No se observan bacilos ácido-alcohol resistentes
1-4 BAAR en una línea (*)	1- 2 BAAR en una línea (*)	“Se requiere confirmación” (**)
5-49 BAAR en una línea	3-24 BAAR en una línea	Positivo (Escasos)
3-24 BAAR por campo	1-6 BAAR por campo	Positivo (+)
25-250 BAAR por campo	7-60 BAAR por campo	Positivo (++)
>250 BAAR por campo	>60 BAAR por campo	Positivo (+++)

(\*) Ver Procedimiento a seguir frente al hallazgo de menos de 5 BAAR en una línea a una amplificación de 200x o menos de 3 BAAR en una línea a una amplificación de 400x.

(\*\*) Solicitar nueva muestra

Problemas frecuentes

Problema	Causa	Solución
Extendido con intensa fluorescencia inespecífica	Insuficiente decoloración	Decolorar más tiempo
	Concentración del ácido muy baja en la solución de decoloración	Verificar la preparación de los reactivos y los resultados del control de calidad
	Auramina no filtrada	Filtrar la solución de auramina diariamente
	Concentración del colorante de contraste más baja que lo establecido	Verificar la preparación de los reactivos y los resultados del control de calidad
	La auramina se ha secado sobre el portaobjetos	Verificar que los extendidos estén nivelados en la bandeja de coloración
	Extendido muy grueso	Preparar un nuevo extendido
BAAR con poca fluorescencia	La solución de auramina ha expirado o ha sido conservada a la luz solar	Controlar la fecha de caducidad de la auramina y guardar en lugar oscuro.
	Solución de auramina a una concentración menor que 0,1%	Verificar la preparación de los reactivos y los resultados del control de calidad
	Auramina mantenida sobre el extendido por menos de 20 minutos	Mantener el colorante al menos 20 minutos
	Extendidos sobrecalentados durante la fijación	Para fijar el extendido, pasar el mismo sobre la llama 3 veces, 1 o 2 segundos cada vez
	Extendidos muy decolorados	Colocar con el decolorante no más de 2 minutos.
	Láminas teñidas expuestas a la luz	Guardar las láminas coloreadas al abrigo de la luz Leer dentro de las 24 hs de haber sido teñidas
	Extendido muy grueso	Preparar un nuevo extendido
Coloración de contraste muy oscura	Tiempo excesivo con el colorante de contraste	No exceder de 60 segundos
	Lavado inadecuado después de la coloración de contraste	Verificar que el lavado se realice cuidadosamente asegurando la eliminación de la solución de contraste
	Concentración del colorante de contraste muy alta	Verificar la preparación de los reactivos y los resultados del control de calidad
	Extendido muy grueso	Preparar un nuevo extendido

## REGISTRO E INFORME DE RESULTADOS

*El informe y registro mediante la escala semicuantitativa estandarizada asegura la reproducibilidad de los resultados y permite evaluar:*

- *la gravedad de la enfermedad*
- *el grado de infectividad del paciente*
- *la evolución del paciente bajo tratamiento*

- Registrar inmediatamente el resultado de la lectura en el Registro del Laboratorio. Marcar los resultados positivos en rojo, para identificarlos rápidamente.
  - Escribir el resultado en el formulario adoptado para el informe por el PNT.
  - Verificar que el informe contenga
    - El nombre del paciente
    - El número de identificación de la muestra
    - El método de tinción utilizado
    - El resultado del examen microscópico expresado según la escala estandarizada
    - La fecha
    - Toda observación que considere relevante, por ejemplo la calidad de la muestra inadecuada
    - Firma del responsable del examen microscópico
  - **Enviar el resultado lo más pronto posible al centro de salud o al médico que solicitó el examen.**
- El tiempo que insume para enviar los resultados es indicador de la eficiencia de su laboratorio.

*Toda demora en la entrega de un resultado positivo puede retrasar el inicio del tratamiento, prolongar el período durante el cual el paciente permanece infeccioso o determinar que se pierda un enfermo. Es necesario el mayor esfuerzo posible para que los resultados de la baciloscopia sean recibidos por la unidad de salud dentro de las 24 horas de entregada la muestra al laboratorio.*

## DECONTAMINACIÓN Y DESECHO DEL MATERIAL

- El principio que rige el manejo de los residuos de los laboratorios que realizan baciloscopias, es que todos los materiales potencialmente infecciosos deben ser preferentemente decontaminados dentro del servicio de laboratorio, ya que los mismos pueden ser peligrosos para aquellos que los transportan para su eliminación final.

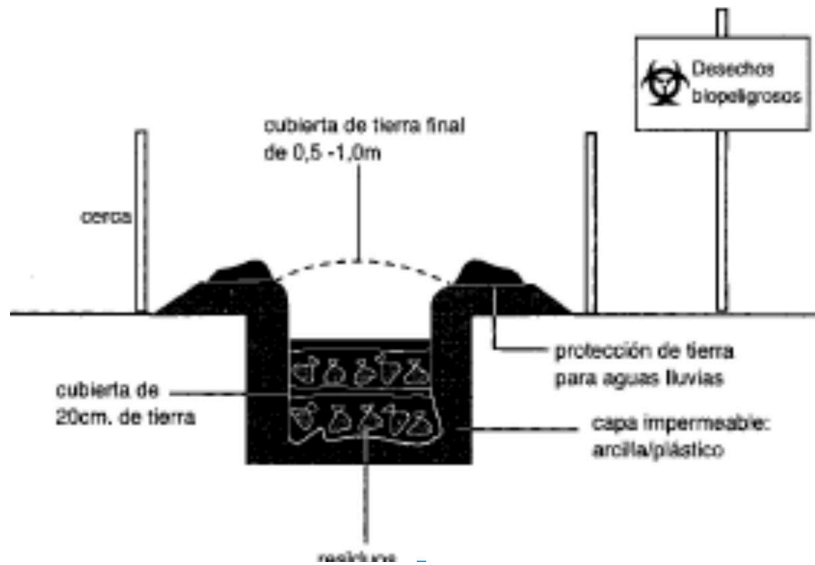
**En base a estos principios, los procedimientos recomendados para la decontaminación y desecho de material son:**

- Desechar las muestras colocándolas en el recipiente de descarte dentro de una bolsa para residuos patológicos junto con los aplicadores y los papeles que eventualmente se hubieran utilizado en todas las etapas.
- Decontaminar el material contenido en este recipiente mediante su autoclavado (a 121°C durante 1 hora). Luego eliminarlos con los desechos patógenos habituales del laboratorio para que sean tratados por el servicio de recolección y tratamiento de residuos que se encarga de esta tarea en el servicio.
- Si el tratamiento anterior no fuera posible, agregar igual volumen de hipoclorito de sodio al 1% al remanente de las muestras no utilizado, dejar los envases tapados hasta el día siguiente, y eliminarlos luego con los desechos patógenos habituales del laboratorio para que sean tratados por el servicio de recolección de residuos que se encarga de esta tarea.

- Si el servicio de salud no contara con un sistema de recolección de residuos patológicos habilitado, el material previamente tratado por autoclave o con hipoclorito de sodio, deberá ser enterrado en una fosa ubicada en un terreno no inundable situada en una zona donde no haya tránsito de personas, animales o vehículos. El foso deberá:

- Tener una distancia mínima entre el fondo y la capa freática no menor a 4 metros.
- Con una profundidad aproximada de 2 m.
- La parte inferior del foso debe estar cubierta por material impermeable de arcilla o plástico. La parte superior del foso se puede cubrir con losetas de hormigón.
- El foso será utilizado hasta que los residuos alcancen una altura de llenado de 0,60 metros, medidos desde el plano superior; sobre ellos se esparcirá una capa de cal y el resto será rellenado con tierra únicamente, previo retiro de las losetas. La cobertura superior quedará sobre elevada y con una pendiente que permita el escurrimiento del agua pluvial, colocándose previamente a ella una capa de material impermeable a nivel de suelo.

Es probable que existan disposiciones especiales para el enterramiento controlado en los diferentes países. Se recomienda consultar al organismo correspondiente sobre la legislación vigente en cada uno de ellos.



Si ninguno de estos procedimientos de descontaminación y desecho del material potencialmente infeccioso está disponible, es posible incinerar el material. 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. Colocar la bolsa en un recipiente del tipo de los de gasolina vacío ubicado en un área abierta fuera de la circulación de personas. 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. Cuando esté frío enterrar el contenido al menos a un metro y medio de profundidad. Este procedimiento debería realizarse al menos semanalmente.

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

- Controlar la exactitud y claridad de la identificación de cada muestra en el envase, lámina, registro e informe de resultado
- No trabajar con más de 12 muestras en cada serie
- Mantener el orden, ubicando cada lámina numerada delante de la muestra correspondiente, en orden ascendente de izquierda a derecha
- Procesar las muestras de a una, no abrir el siguiente envase antes de cerrar el anterior
- Maniobrar con suavidad el envase de las muestras
- No introducir en el envase de una muestra aplicadores utilizados con otra
- Utilizar láminas nuevas, sin marcas y libres de grasitud
- Seleccionar la partícula mucopurulenta
- Extender homogéneamente suficiente cantidad de la partícula útil, sin exceso, sobre el portaobjetos
- Mantener los extendidos separados unos de otros en todo momento
- No tocar los frotis con las manos, goteros, varillas o grifos
- Evitar salpicaduras con las soluciones o el agua
- Filtrar la fucsina fenicada en el momento de uso, calentarla hasta desprendimiento de vapores, sin hervir y dejarla actuar 5 minutos (realizando otros dos calentamientos durante este lapso)
- Filtrar la solución de Auramina O en el momento de uso, dejarla actuar al menos 20 minutos, sin calentar
- Eliminar el agua remanente de lavados
- Descartar y volver a preparar frotis que por accidente se hayan superpuesto o resulten mal coloreados
- En el caso de la microscopía de ZN limpiar la lente del microscopio luego de leer cada lámina y dedicar no menos de 5 minutos a la lectura de cada preparado
- Cuantificar bacilos en el extendido utilizando la escala estandarizada
- Evitar toda demora que pueda ser eliminada
- Encaminar para prueba rápida molecular/cultivo las muestras de los casos que lo requieran.

## SISTEMA DE REGISTROS

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

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

Los laboratorios de la Red deben contar con los siguientes instrumentos estandarizados por el PNT: Formulario de Solicitud de Bacteriología y Registro de Muestras para Investigación Bacteriológica de la Tuberculosis. En el Anexo IV se presentan modelos de estos instrumentos y del registro de preparación/control de calidad de colorantes.

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

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



## ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LAS BACILOSCOPIAS

El programa de aseguramiento de la calidad es la parte del sistema de gestión de calidad destinado a brindar confianza en que una organización cumple con los requisitos de calidad.

Permite evaluar si la información producida por el laboratorio es precisa, reproducible y oportuna.

Instaura un sistema de alarmas que permite prevenir, descubrir y corregir errores.

Las actividades clásicas de un programa de aseguramiento de la calidad de baciloscopias incluyen:

- el control de calidad interno,
- la evaluación externa de calidad y
- el mejoramiento continuo.

En este manual describiremos fundamentalmente los procesos necesarios para el control de calidad interno de la baciloscopia, ya que son aquellos que están bajo la responsabilidad del laboratorio que realiza las baciloscopias.

### CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

El control de calidad interno comprende

- la evaluación de
  - materiales, equipos, reactivos
  - el desempeño del personal
  - los procedimientos
  - la exactitud y precisión de los registros/ informes
  - la oferta y aplicación adecuada de la baciloscopia
  - el rendimiento de la baciloscopia
- el monitoreo de los resultados de los controles internos
- las medidas correctivas a aplicar cuando la imprecisión del resultado excede los límites considerados aceptables o se producen demoras evitables

## CAUSAS DE ERROR EN LA MICROSCOPÍA

		Falsos positivos	Falsos negativos
<b>Inherentes a la muestra</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No representativa de la lesión</li> <li>- Recogida en momento inadecuado</li> <li>- Insuficiente</li> <li>- Mal conservada (bacteriólisis)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> </ul>
<b>Inherentes al operador</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Mala selección de la partícula útil</b></li> <li>▪ <b>Defectos en la realización del extendido:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- extendidos finos, gruesos (especialmente en la técnica de fluorescencia) o poco homogéneos</li> <li>- uso de portaobjetos rayados o sucios</li> <li>- fijación de extendidos húmedos o a temperaturas superiores a 60°C</li> </ul> </li> </ul>	X	<ul style="list-style-type: none"> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Defectos en la realización de la coloración de ZN:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mantenimiento del extendido con la fucsina por un período menor a 5 minutos en caliente</li> <li>- fucsina de calidad deficiente</li> <li>- calentamiento deficiente o excesivo</li> <li>- decoloración insuficiente</li> <li>-precipitación de cristales por uso de reactivos no filtrados o calentamiento excesivo</li> <li>-decoloración excesiva</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X</li> <li>X</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Defectos en la realización de la coloración fluorescente</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mantenimiento del extendido con la Auramina O por un período menor a 20 minutos</li> <li>-uso de solución de Auramina O luego de un mes de su preparación</li> <li>- decoloración insuficiente</li> <li>- precipitación de cristales por uso de reactivos no filtrados</li> <li>- decoloración excesiva</li> <li>- coloración de contraste por más de 1 minuto</li> <li>- retraso en la lectura o conservación de las láminas coloreadas fuera del abrigo de la luz</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X</li> <li>X</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> <li>X</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Defectos en la lectura:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ uso de microscopio en mal estado</li> <li>▪ lectura de un número insuficiente de campos</li> <li>▪ observación de 1 solo nivel del extendido</li> <li>▪ poca capacidad para diferenciar bacilos de artificios de coloración.</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Transferencia de bacilos de un extendido a otro, dispensador de aceite de inmersión contaminado.</b></li> <li>▪ <b>Confusión de muestras y/o extendidos</b></li> <li>▪ <b>Errores en transcripción de resultados</b></li> </ul>	X	X
		X	X
		X	X
<b>Inherentes a la técnica</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Límite de sensibilidad 5.000-10.000 bacilos/ml</li> <li>▪ Especificidad: se detectan BAAR que pueden ser no patógenos y nocardias.</li> </ul>	X	X

## Control de colorantes, coloración y microscopio

Para el control de calidad de colorantes, coloración y del microscopio se realizan los siguientes procedimientos:

- Preparar extendidos con muestras positivas y negativas siguiendo los siguientes procedimientos:

### Preparación de los controles positivos no teñidos

- Utilizar esputos con baja positividad (1+).
- Dejar estos esputos por uno o más días a temperatura ambiente, para que el esputo se licue.
- Mezclar (con el contenedor de esputo cerrado). Dejar reposar el recipiente al menos 20 minutos, agregar 5 a 10 gotas de fenol al 5% y dejar durante 1 hora.
- Realizar al menos 50 extendidos, dejar secar al aire y fijar por calor.

- Chequear el número promedio de BAAR coloreando unos pocos extendidos (por ej. 6) seleccionados al azar de todo el lote. Registrar el resultado del promedio de BAAR observado en las 6 láminas.

- Guardar los extendidos en una caja marcada como "Láminas de control positivas".

- Si no se reciben suficientes muestras positivas como para preparar los controles positivos, solicitar los extendidos o una muestra de esputo de baja positividad para preparar los controles al laboratorio de referencia.

### Preparación de los controles negativos no teñidos

- Asegurarse que el esputo usado para preparar extendidos negativos ha sido examinado rigurosamente para certificar que no hay BAAR.
- Agregar 5 a 10 gotas de fenol al 5%, dejar durante 1 hora y luego preparar tantos extendidos como sea posible.
- Dejar secar los extendidos al aire y fijar por calor.

-Guardar los extendidos en una caja marcada como "Láminas de control negativas"

Guardar los frotis preparados en cajas diseñadas para guardar extendidos o dentro de una caja envueltas en papel suave, bien acondicionados, en lugar seco.

### **Control de calidad de cada nuevo lote de colorantes**

- Controlar la calidad de cada nuevo lote de colorantes tiñendo dos láminas negativas y dos positivas.
- Las láminas negativas deberán ser teñidas tres veces para incrementar la probabilidad de identificar contaminantes provenientes del agua de preparación de los colorantes que pudieran adherirse a los extendidos.
- Registrar el resultado de este control en el libro de preparación/control de reactivos (Ver Anexo IV).
- Comprobar que los BAAR se vean completa e intensamente coloreados con fucsina o auramina y que la coloración de fondo sea uniforme, del color esperado y que ofrezca buen contraste. Verificar si la cuantificación de los bacilos coincide con la inicialmente asignada a la muestra con la que se prepararon los extendidos positivos.
- Si el resultado no fuera satisfactorio para el teñido de BAAR, repetir nuevamente la coloración empleando otros controles, para asegurarse que el error no estuvo en la técnica de coloración.
- Si en este segundo control, la coloración fuera defectuosa o el número de BAAR observado fuera inferior al esperado, desechar la fucsina, auramina y/o alguno de los otros reactivos.
- Registrar el lote que resultó anómalo y descartar las soluciones insatisfactorias.

### **Control de calidad de colorantes en uso/coloración**

- Si se realizan más de 10 baciloscopias por día, es conveniente colorear un control positivo y uno negativo al menos una vez por semana. Si se realizan menos de 10 baciloscopias por día se deben incluir los frotis positivo y negativo como control diariamente. Registrar estos resultados en el libro de registro de investigación bacteriológica.

### **Control de registro e informes**

- Disponer que una persona no involucrada en la realización e informe de la baciloscopia verifique un día por semana al azar que los datos y resultados consignados en los informes elaborados ese día coincidan exactamente con los registrados en el Libro del Laboratorio. Esto debe ser realizado por el responsable del laboratorio en el caso en que él mismo no procese e informe muestras. Registrar esta actividad.
- Verificar que las muestras estén siendo procesadas en el día en que fueron recibidas o al día siguiente. Si el laboratorio no puede hacer baciloscopias todos los días, o si recibe muestras de centros periféricos, verificar que no transcurran más de 3 días desde que las muestras fueron tomadas hasta que son procesadas.
- Controlar que los resultados de las baciloscopias se estén entregando regularmente 24 horas o a lo sumo 48 horas después de procesada la muestra.
- Verificar que los resultados sean recibidos, en el servicio en el que el paciente entregó su muestra o en el consultorio del médico que solicitó el estudio en el menor tiempo posible por más alejado que esté.

- Verificar que hayan sido derivadas para cultivo/ métodos moleculares rápidos las muestras que requieren ser procesadas por estos métodos según lo detallado anteriormente.

## Monitoreo de indicadores de desempeño

- Los Indicadores de desempeño (ID) son útiles para la evaluación interna de la calidad de la microscopía. Deberán ser calculados mensualmente o trimestralmente a partir de los conteos del Registro de Laboratorio. Cada laboratorio es responsable de calcular sus ID.
- El monitoreo de la tendencia de estos ID permite reconocer un cambio en los patrones normales. La identificación de valores muy altos o muy bajos puede indicar un problema. Aunque existen rangos de valores definidos como aceptables para estos indicadores, el valor normal de los mismos depende en algunos casos, de ciertas condiciones locales.
- Realizar un análisis de los siguientes datos:
  - N° de baciloscopias de diagnóstico (a)
  - N° total de baciloscopias de diagnóstico positivas (b)
  - N° de baciloscopias de diagnóstico positivas de baja codificación (Positivas contables y 1+) (c)
  - N° de baciloscopias de control de tratamiento (d)
  - N° de baciloscopias de control de tratamiento positivas (e)

A partir de estos valores calcular los siguientes indicadores:

Indicador	Cálculo	Valor de referencia sugerido
Carga de trabajo	Nº de baciloscopias de diagnóstico + Nº de baciloscopias de control de tratamiento $a + d$	definir a nivel local
Porcentaje de baciloscopias de diagnóstico positivas	Nº de baciloscopias de diagnóstico positivas x 100/ Nº total de baciloscopias de diagnóstico $b \times 100 / a$	definir a nivel local
Porcentaje de baciloscopias de control de tratamiento positiva	Nº de baciloscopias de control de tratamiento positivas x 100 / Nº total de baciloscopias de control de tratamiento $e \times 100 / d$	5-10%
Porcentaje de baciloscopias de diagnóstico positivas de bajo grado (pos 1+ y contables)	Nº de baciloscopias de diagnóstico positivas de bajo grado x 100 / Nº total de baciloscopias de diagnóstico positivas $c \times 100 / b$	30-50%

Graficar estos datos e indicadores mensualmente o trimestralmente para obtener una línea de tendencia (la variabilidad de los indicadores puede ser muy grande si los denominadores -los totales- de los porcentajes son pequeños). Si estos valores se alejan bruscamente de los habitualmente encontrados, se deben investigar las causas.

- Si se detecta una sucesión de resultados positivos en uno o unos pocos días de trabajo, investigar si no se ha producido contaminación cruzada de bacilos, desde una muestra altamente positiva a las siguientes.

Consultar al laboratorio de referencia si se detectan anomalías y no se pueden identificar las causas.

**Nota:** éstos y otros indicadores de desempeño pueden ser solicitados por la coordinación de la red de laboratorios, a fin de comparar el rendimiento del laboratorio con otros laboratorios ubicados en la misma área geográfica.

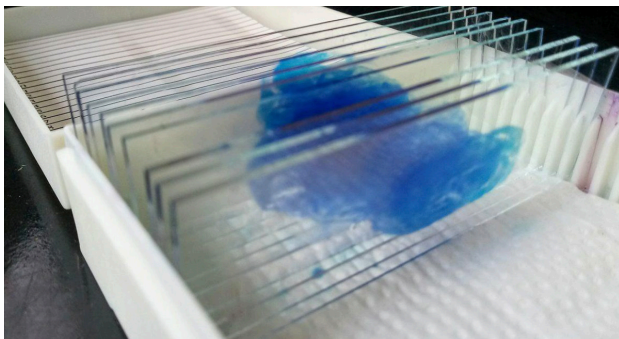
## EVALUACIÓN EXTERNA DE CALIDAD

### Método de relectura de láminas

Para poder participar de la metodología de evaluación externa de baciloscopias por el método de relectura, se requiere que **todas las láminas** de baciloscopias efectuadas en los laboratorios locales sean conservadas hasta que se haya seleccionado una muestra para su relectura.

Para conservarlas es necesario seguir las siguientes indicaciones:

- Si fueron coloreadas por ZN, quitar el aceite de las láminas leídas, dejando los portaobjetos en posición vertical sobre un papel absorbente (papel de diario o de cocina) hasta la mañana siguiente. Luego apoyar el portaobjetos suavemente “boca abajo” sobre otra tira de papel absorbente. Nunca intentar remover el remanente de aceite por frotado del extendido. Para evitar la contaminación, utilizar siempre un trozo de nuevo de papel adsorbente.
- Comprobar que la numeración esté visible en las láminas.
- Guardarlas en cajas de láminas portaobjetos o dentro de una caja común envueltas individualmente en papel, en paquetes que agrupen las de un día o una semana, con un rótulo en el que figure la fecha de realización. No poner sobre este rótulo los resultados de cada una.
- Conservarlas en lugar seco y fresco.



### Pruebas de eficiencia

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

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

***Normalmente son requeridos los registros de laboratorio y los resultados de control de calidad interno y de la evaluación externa de calidad durante la visita de asistencia técnica. Deben estar disponibles.***

## BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA

1. Aziz MA, Ba F, Becx-Bleumink M, Bretzel G, Humes R, Iademarco MF, Sang Jae Kim, Lamothe F, Paramasivan CN, Ridderhof J, Sloutsky A, Van Deun A, Shah KV, Weyer K. External Quality Assessment for AFB Smear Microscopy. WHO, APHL, CDC, IUATLD, KNCV, RIT. Washington DC, 2002. Disponible en: [https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/External\\_Quality\\_Assessment\\_for\\_AFB\\_Smear\\_Microscopy.pdf](https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/External_Quality_Assessment_for_AFB_Smear_Microscopy.pdf)
2. Blancarte L, de Kantor, I, Latini O, Laszlo A, Valenzuela P, Yáñez A. INPPAZ. Bacteriología de la tuberculosis. La muestra. El examen microscópico. Nota Técnica N° 26 / Rev1. OPS/OMS. Martínez (Buenos Aires, Argentina), 1988.
3. Fujiki A. TB microscopy. Tokio, Japan: The research Institute of Tuberculosis, Japan Antituberculosis Association, Japan International Corporation Agency, Hachioji International Training Centre, 1998.
4. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Technical guide for sputum examination for tuberculosis by direct microscopy. Bull Int Union Tuberc 1978;4-16. Disponible en: [http://www.tbonline.info/media/.../iuatld\\_afb\\_microscopy\\_guide.pdf](http://www.tbonline.info/media/.../iuatld_afb_microscopy_guide.pdf)
5. Laszlo A. et al. Guía Técnica para los países con escasos recursos económicos. Diagnóstico de la tuberculosis por examen microscópico directo de la expectoración. Quinta edición. París. IUATLD, 2000.
6. Lumb R, Van Deun A, Bastian I, Fitz-Gerald M. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis by Sputum Microscopy. The handbook. Global Laboratory Initiative. Australia, 2013. Disponible en: [http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/TB\\_Lab\\_Diagnosis\\_Sputum\\_Microscopy\\_Handbook.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/TB_Lab_Diagnosis_Sputum_Microscopy_Handbook.pdf)
7. Organización mundial de la salud. Los servicios de laboratorio en el control de la tuberculosis. II Microscopía. WHO Global Programme. WHO/TB/98.258. Ginebra 1998.
8. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis. WHO/HTM/TB/2012.11. 2012. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92661/1/9789243504636\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92661/1/9789243504636_spa.pdf?ua=1)
9. Organización Panamericana de la Salud. Manual de Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 1: Baciloscopia. OPS, Washington. 2008. Disponible en: <http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloscopia.pdf>
10. Rieder HI, Van Deun A, Kam KA, Kim SJ, Chonde TM, Trébucq A, Urbancik R, Priorities for tuberculosis bacteriology services in a Low-Income Country. IUATLD. París, 2007.



- 11.** Stop TB Partnership (2014) Mycobacteriology Laboratory Manual. Disponible en: [http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli\\_mycobacteriology\\_lab\\_manual\\_web.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf)
- 12.** Stop TB Partnership (2017) GLI Guide toTB Specimen Referral Systems and Integrated Networks. Disponible en: [http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI\\_Guide\\_specimens\\_web\\_ready.pdf](http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/GLI_Guide_specimens_web_ready.pdf)
- 13.** Van Deun A, Aung KJM, Hamid Salim A, Gumusboga M, Nandi P, Hossain MA. Methylene blue is a good background stain for tuberculosis light-emitting diode fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:1571-1575.
- 14.** Van Deun A, Hossain MA, Gumusboga M, Rieder HL. Ziehl-Neelsen staining: theory and practice. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12:108-110.
- 15.** WHO. Proposed reduction of number of smears for the diagnosis of pulmonary TB: Background document. Geneva, 2008. Disponible en: <http://www.who.int/tb/dots/laboratory/Reduction%20of%20smears.pdf>
- 16.** World Health Organization. Xpert MTB/RIF implementation manual. Technical and operational “how-to”; practical considerations. WHO. Geneva, 2014. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112469/1/9789241506700\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112469/1/9789241506700_eng.pdf)
- 17.** World Health Organization. Policy statement: Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis. WHO/HTM/TB/2011.8, 2011. Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/978921501613\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/978921501613_eng.pdf)

## NORMAS MÍNIMAS DE BIOSEGURIDAD

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

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

### Información y control médico del personal del laboratorio

Las personas con inmunidad reducida, por ejemplo, causada por la infección por el VIH, la diabetes o el embarazo, pueden estar a mayor riesgo de desarrollar TB en caso de infectarse con el bacilo, por lo que en esos casos quizá sea preciso adoptar precauciones añadidas, como por ejemplo asignarles tareas en un área de bajo riesgo de infección. Los que padecen enfermedades pulmonares crónicas deben contar con autorización de su médico para ser incorporados a las tareas del laboratorio.

- En el momento de ingreso, el personal deberá ser claramente instruido acerca de cómo se transmite la tuberculosis y las medidas de bioseguridad que deberá aplicar en su trabajo cotidiano. Para ello el laboratorio debe contar con un documento escrito que el personal debe leer. Debe ser evaluado el grado de comprensión, registrada la evaluación y archivada en su hoja de vida.

- Son necesarias reuniones periódicas con todo el personal de laboratorio, destinadas a recordar las medidas de bioseguridad, analizar si se están cumpliendo con regularidad, dilucidar las causas de los accidentes que pudieran haberse producido y realizar las correcciones que fueran necesarias en la rutina de trabajo

- Los laboratoristas deben ser incorporados a un programa regular de control médico para los trabajadores de salud, siguiendo la normativa laboral vigente en el país y las establecidas por el PNT. Si no hubiera política adoptada o ésta no contemplara la vigilancia de infecciones por vía respiratoria, el supervisor debe asegurar que el personal de laboratorio tenga como mínimo una evaluación médica anual que puede incluir examen radiológico de tórax.

- Cuando el personal presente síntomas respiratorios por más de 15 días, se deberá disponer su examen médico, radiología de tórax y el examen por baciloscopia y cultivo y/o prueba rápida molecular de muestras de esputo, según lo establezcan las políticas nacionales de uso de pruebas diagnósticas de TB.
- Cada laboratorio debe contar con instrucciones escritas y difundidas sobre el manejo de pacientes con tuberculosis y de las muestras biológicas obtenidas de los mismos. En cada sección deben estar expuestas las normas básicas de bioseguridad específicas para cada tipo de tarea.
- El personal debe conocer quien es el supervisor responsable a quien le debe notificar inmediatamente cualquier accidente de trabajo.

## Precauciones generales de trabajo

Básicamente es necesario aplicar todas las medidas lógicas para evitar la generación y movimiento de aerosoles que son el vehículo más peligroso para transmitir y transferir 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 de manipulación de muestras del laboratorio.
- Al finalizar la tarea, desinfectar las superficies de mesadas donde se realizaron los extendidos y donde se apoyaron recipientes con material potencialmente infeccioso.
- 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 retirar de la misma, libros de registro o elementos allí utilizados.
- Utilizar preferentemente bata de manga larga y cerrada atrás. También son aceptables las batas de laboratorio con abertura frontal y manga larga para cubrir la ropa de calle.
- No sacarla del centro de salud, donde debe ser lavada con jabón y agua caliente. La bata es útil para proteger de las sustancias químicas, colorantes y salpicaduras accidentales con muestras, pero no contra la infección por vía aerógena.
- No colocar carteras, teléfonos celulares o ropa sobre las mesadas de laboratorio donde se realizarán procedimientos diagnósticos.
- No es necesario utilizar protectores respiratorios para realizar baciloscopias. Se puede considerar su uso si los recursos son suficientes. En caso de utilizarlas elegir respiradores N95 (norma de los EE. UU) y el FFP2 (norma europea) (también denominados mascarillas); que retengan partículas del orden de los 0,3 micrones, que aseguren al menos 95% de protección, que tengan cierre seguro por sobre la nariz y alrededor de la boca. Los barbijos de cirugía dejan pasar el bacilo de la tuberculosis y dan una falsa sensación de seguridad. Las mascarillas deben ser de uso personal. Pueden ser reutilizados 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 no herméticas (de cartón) para evitar que se quiebren y que se obstruyan sus poros con polvo ambiental. Para que no se mantengan húmedas, es necesario evitar colocarlas dentro de envolturas plásticas.

- Si se utilizan respiradores en un laboratorio, todo el personal debe ser instruido y capacitado para utilizarlos y ajustarlos correctamente, así como advertido de sus limitaciones. Seguir las instrucciones del fabricante para el empleo y operación de respiradores.

- Para colocarse una mascarilla desechable nueva
  - Colocar primero la cofia (si se emplea)
  - Tomar con una mano la mascarilla por la parte externa, dejando libres las tiras elásticas de ajuste
  - Posicionar la mascarilla cubriendo la nariz y boca
  - Tomar la tira elástica superior y ajustarla en la cabeza a la altura de la nuca, por sobre las orejas
  - Tomar la tira elástica inferior, deslizarla rodeando la cabeza hasta ajustarla en el cuello
  - Ajustar la pieza metálica que se ubica sobre la nariz, presionando con los dedos desde la nariz hacia las orejas
  - Comprobar el ajuste de la mascarilla

Para retirar la mascarilla

- Quitarse primero los guantes (ver instrucciones abajo) y lavarse las manos
- Quitarse luego la mascarilla tomando únicamente las tiras elásticas, sin tocar la parte externa de la mascarilla que es la potencialmente contaminada, ni la interna para no contaminarla

- El uso de guantes es indispensable cuando se trabaja con muestras biológicas. Los guantes se cambiarán con regularidad y no deben reutilizarse.

- Adiestrar al personal del laboratorio para retirarse los guantes siguiendo estos pasos:

- Retirar un guante agarrándolo por debajo del puño y obligándolo a enrollarse para sacarlo de la mano de modo que salga con el interior hacia fuera. Con esto se consigue que la mayor parte de la contaminación quede dentro;

- Sujetar el guante usado en la otra mano, aún enguantada. Deslizar cuidadosamente los dedos desnudos bajo el puño del guante de la mano enguantada, cuidando de no tocar la superficie

del guante contaminado. Enrollar el guante hacia fuera, por encima del otro guante usado para hacer una pequeña bolsa de guantes usados con la contaminación hacia el interior.

- Desechar los guantes debidamente y en condiciones de seguridad.

- Lavarse las manos con frecuencia, aun cuando se usen guantes.

- Lavarse las manos siempre antes de abandonar el laboratorio.

- No tocar instalaciones, material de escritorio o equipamiento del laboratorio sin antes quitarse los guantes y lavarse las manos.

- No beber, comer, ni fumar en el área de trabajo donde se procesa material potencialmente infeccioso. Tampoco usar celulares, ni equipos personales para escuchar música.

- No introducir en la boca, por ningún motivo, ningún elemento utilizado o existente en el laboratorio.

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

- Recolectar las muestras de esputo en un lugar bien ventilado, nunca en el laboratorio, utilizando frascos de boca ancha y cierre hermético.

- Evitar en lo posible las nebulizaciones, usar mascarillas de bioseguridad al realizar fibrobronoscopías o nebulizaciones.

- Comprobar que no haya derrames en las muestras; desinfectar el exterior del envase si lo hubiera.

- Acondicionar y transportar las muestras en cajas que puedan ser desinfectadas, resistentes y con cierre hermético.

- Asegurar que los envases con muestras estén siempre en posición vertical.
- Si estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases con las muestras al menos durante 20 minutos antes de abrir las tapas, abrir cada tapa con cuidado y cerrarla herméticamente luego de tomar la muestra.
- Sistematizar el procesamiento de las muestras.
- Al preparar frotis, es preferible utilizar palillos de madera o asas desechables en lugar de asas reutilizables, que es preciso esterilizar por calor.
- Si se emplea un asa reutilizable, debe esterilizarse por calor en un microincinerador cerrado o un mechero Bunsen. Las asas reutilizables se limpiarán en un frasco de arena y alcohol antes de la esterilización.
- Realizar movimientos lentos y suaves cuando se hacen los frotis.
- Disponer siempre de un frasco con fenol al 5% o de hipoclorito de sodio al 1%.
- Trabajar con un mechero entre las muestras y el operador al realizar los extendidos.
- Conservar los bordes de las láminas limpios, sin muestra.
- No mover ni fijar con calor los frotis hasta que se hayan secado al aire por completo.
- Colorear las láminas tan pronto estén secas y fijadas a la llama.
- Organizar el descarte seguro de los materiales utilizados en recipientes con desinfectantes y tapas.

## Manipulación y uso de desinfectantes

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

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

La solución de hipoclorito de sodio de uso doméstico de buena calidad contiene 55g/l (5,5%) de cloro, puede variar entre el 3 y 6%. Por eso habitualmente se prepara cada solución de la siguiente forma:

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

Elegir lejía o agua lavandina de buena calidad. Mantenerla al abrigo de la luz, en un lugar fresco y con la tapa bien cerrada para evitar que se deteriore. En los envases figura la fecha de envasado, debe ser controlada al adquirirla. Las diluciones deben ser hechas diariamente, porque pierde actividad rápidamente. Dada su naturaleza sumamente alcalina, puede corroer los metales.

### Tener en cuenta que el fenol es corrosivo y tóxico:

- Mantener el fenol concentrado en frascos con cierre hermético, en un lugar fresco, al abrigo de la luz y preferentemente en un lugar dedicado al almacenamiento alejado del área de trabajo.
- Mantener el fenol al 5% al alcance de la mano, pero en frascos con cierre hermético que evite que se escapen vapores.

- Evitar el contacto directo del fenol con la piel o mucosas. Utilizar guantes para manipularlo.
- Reducir los vapores de fenol que se desprenden de la fucsina ubicando la tinción de los extendidos en un área bien ventilada y limitando el número de extendidos a colorear a 12.

## **Manipulación de otras sustancias químicas**

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

## **Procedimientos frente a un accidente de trabajo**

- Aunque no es necesario utilizar respiradores para realizar baciloscopias, estos deben estar disponibles en caso de accidente.
- Ante cualquier rotura de envases o salpicadura con material potencialmente infeccioso, de inmediato hacer retirar al personal del área, durante al menos una hora para permitir que los aerosoles sean eliminados por el sistema de ventilación del laboratorio y que se depositen las partículas más pesadas.
- Se colocarán signos para indicar que la entrada está prohibida durante este lapso y el proceso de limpieza.
- Transcurrido este tiempo ponerse los respiradores, cubrir inmediatamente la zona con papel y embeberlo con fenol al 5% o con hipoclorito de sodio al 1% y dejar actuar el tiempo establecido (al menos media hora).

- Luego de transcurrido un tiempo apropiado, recoger el material contaminado en una bolsa cerrada para eliminarlo debidamente.

- Si hay vidrios rotos u otros objetos punzocortantes, utilizar un trozo de cartón rígido para reunir el material y colocarlo en un recipiente a prueba de perforaciones para eliminarlo.

- Limpiar y desinfectar la zona del derrame.

- 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%.

- Si se produce una salpicadura que afecte el ojo con material potencialmente infeccioso o un reactivo, lavarlo con agua destilada estéril 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 descriptas.

- Toda vez que se hubiera producido el contacto de una muestra 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.

- Se mantendrá un registro de incidentes o accidentes.

**ANEXO II****PREPARACIÓN DE REACTIVOS****PARA LA TECNICA DE ZIEHL NEELSEN****Fucsina básica fenicada 0,3%**

Fucsina básica (*)	3 g
Etanol 95°	100 ml
Cristales de Fenol (**)	50 g.
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

(\*) Mínimo contenido de colorante puro activo 85%. Si el contenido declarado fuera menor de éste se debe hacer la corrección de la pesada (Ver Precauciones con los colorantes), si figura 85% o más, no es necesaria la corrección de pesada.

(\*\*) Los cristales de fenol deben ser incoloros. Los cristales de fenol son corrosivos, tóxicos y pueden causar quemaduras; evite el contacto con la piel y las mucosas; prepare en ambiente bien ventilado.

En un Erlenmeyer de 1 litro, disolver 50 g de cristales de fenol en 100 ml de etanol. Adicionarle los 3 g de fucsina básica, mezclando bien hasta disolver.

Agregar el agua destilada hasta completar un litro. Guardar la solución en frasco color ámbar, con buen cierre.

Rotular con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente, al abrigo de la luz durante no más de 12 meses.

Filtrar al momento de usarla.

**Solución decolorante.**

Agregar siempre el ácido al etanol, suavemente, y no al revés ya que podrían provocarse salpicaduras por la intensa generación de calor que se produce cuando se invierte este proceso.

Ácido clorhídrico p.a	30 ml
Etanol 95°	970 ml

Rotular la botella color ámbar con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente por no más de 12 meses.

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

Ácido sulfúrico concentrado (calidad técnica)	250 ml
Agua destilada	750 ml

Agregar el ácido al agua, lentamente, agitando suavemente. Rotular la botella color ámbar con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente por no más de 12 meses.

### Azul de metileno 0,1%

Cloruro de azul de metileno	1 g
Agua destilada	1000 ml

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 en un armario por no más de 12 meses. Filtrar antes de usar.

## PARA LA TINCIÓN FLUORESCENTE

### Auramina-O

#### Solución 1 (Auramina-O 1%)

Manipular la auramina con guantes. Es cancerígena y debe evitarse todo contacto directo con el polvo o la solución.

Auramina-O	10 g
Etanol 95°	1000 ml

Disolver el polvo de auramina-O en etanol. Es preferible utilizar agitador magnético; de no contarse con él, dejar la Auramina-O en etanol de un día para otro.

Rotular la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Esta solución es estable por 12 meses guardada en frasco color caramelo al abrigo de la luz.

### Solución 2

Cristales de fenol (*)	30 g
Agua destilada c.s.p.	900ml

(\*) Los cristales de fenol deben ser incoloros. Los cristales de fenol son corrosivos, tóxicos y pueden causar quemaduras; evite el contacto con la piel y las mucosas; prepare en ambiente bien ventilado.

Disolver los cristales de fenol en el agua. Rotular la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Esta solución es estable por 12 meses guardada en frasco color caramelo al abrigo de la luz.

### Solución de trabajo: Auramina-O 0,1%

En una botella color caramelo colocar 50 ml de solución 1 y 450 ml de la solución 2.

Ajustar la tapa del frasco.

Mezclar bien y dejar reposar de un día para otro.



La Auramina-O recientemente preparada tiene un color intenso amarillo oro. Si el colorante resulta pálido, descartarlo.

Rotular con el nombre del reactivo y las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente, alejado del calor y protegido de la luz, no más de un mes.

Filtrar la Auramina cuando se aplica sobre los extendidos o cuando se carga la canasta de coloración durante el proceso de tinción de las láminas.

### Solución decolorante

Ácido clorhídrico p.a	5 ml
Etanol c.s.p.	1000 ml

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

Colocar en botella color caramelo, rotular la botella con el nombre del reactivo y con las fechas de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente por no más de 12 meses.

Donde sea difícil adquirir alcohol, puede emplearse la siguiente solución decolorante

Ácido clorhídrico p.a	10 ml
Etanol	100 ml
Agua destilada	890 ml

Cuidadosamente agregar el alcohol sobre el agua destilada.

Cuidadosamente adicionar el ácido a la solución de etanol al 10% en agua.

Colocar en botella color ámbar, rotular la botella con el nombre del reactivo y con las fechas

de preparación y vencimiento. Almacenar a temperatura ambiente por no más de 12 meses.

### Colorantes de contraste

Pueden usarse solución 0,5% de permanganato de potasio o solución 0,3% de azul de metileno. La elección depende del tipo de microscopio empleado. En algunos sistemas, el permanganato produce un fondo muy oscuro que dificulta el mantenimiento de foco durante la lectura; en estos casos se aconseja emplear el azul de metileno, aun cuando el contraste es menor.

### Solución de Permanganato de potasio 0,5%

Permanganato de potasio	5 g
Agua destilada	1000 ml

Colocar el permanganato de potasio en el interior de un Erlenmeyer de 2 litros de capacidad conteniendo 500 ml agua destilada.

Agitar hasta disolver.

Agregar los restantes 500 ml de agua y agitar.

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 12 meses.

La solución debe ser color púrpura. Si se transforma en rojiza significa que el permanganato se ha oxidado y la solución debe ser descartada.

### Solución de azul de metileno 0,3%

Azul de metileno	3 g
Agua destilada	1000 ml

Colocar el azul de metileno en el interior de un Erlenmeyer de 2 litros de capacidad conteniendo 500 ml agua destilada

Agitar hasta disolver.

Agregar los restantes 500 ml de agua y agitar.

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 12 meses.

## PRECAUCIONES CON LOS COLORANTES

- 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 85%. Si no fuese así, deben ajustarse las cantidades teniendo en cuenta el grado de pureza. Ej.: si la pureza de la fucsina fuera 75%, divida 3 g en  $0.75=4$  g. Se pesarán 4 g en lugar de 3 g.
- Utilizar guantes para manipular todos los reactivos.
- Verificar que el fenol no esté pigmentado. Debe conservarse al abrigo de la luz para evitar su oxidación
- Si bien los colorantes de la tinción de Ziehl Neelsen pueden ser utilizados durante 12 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 12 meses, debe ser descartado.
- Mantener todas las soluciones preferentemente en envases color ámbar, cerrados herméticamente y protegidos de la luz. Si no se dispone de frascos

color ámbar, pueden ser envueltos en papel metálico. Lavar bien estos frascos antes de reutilizar enjuagándolos con alcohol o con la misma solución decolorante para disolver los cristales que pudieran haberse formado.

- Si se usan colorantes listos para usar preparados por la industria, consultar a los responsables de la Red de Laboratorios sobre su calidad ya que es muy variable.
- Mantener un registro en donde anote la fecha y el volumen de cada reactivo que se ha preparado y el resultado del correspondiente control de calidad (Ver modelo en anexo IV)

## CUIDADO 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 una precisión de 0,1 g. 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 patillo) 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 los colorantes 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. 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.

- Limpiar la balanza con un cepillo suave y limpio después de su uso. Remitirse al manual del fabricante para otras instrucciones sobre limpieza. Los platos de la balanza y el área de trabajo puede ser desinfectados con etanol 70%.
- Cuando la balanza no esté en uso, mantenerla bajo un cobertor de plástico hermético para protección contra polvo. Colocarle un platillo con sílice azul debajo del cobertor para eliminar la humedad del aire (cuando la sílice desecante se torne rojo, se debe regenerar por calentamiento).
- Utilizando una pesa de miligramo/gramo apropiada, verifique diariamente que el peso registrado por la balanza coincide con los pesos de calibración.
- La calibración de la balanza debe llevarse a cabo anualmente o después de cualquier reparación o reubicación por un servicio técnico calificado, y debe asentarse en el registro correspondiente. La reparación de la balanza debe llevarse a cabo por un servicio técnico calificado.

## CÁLCULO DE STOCK DE REACTIVOS

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

El siguiente es un ejemplo de cómo se calcula el número de baciloscopias a realizar durante un trimestre:

Suponiendo que:

- la proporción de casos detectados por baciloscopia entre los sintomáticos investigados es del 5% (es decir que entre 20 SR examinados se encuentra 1 caso con baciloscopia positiva)
- cada sintomático es investigado mediante 2 baciloscopias
- cada caso de tuberculosis con baciloscopia positiva es monitoreado con 3 exámenes de control
- se han diagnosticado aproximadamente 10 casos por baciloscopia en un trimestre.

Será necesario realizar 43 baciloscopias por cada caso detectado por baciloscopia, según se obtiene con el siguiente cálculo:

$$(1 \text{ caso de tuberculosis} + 19 \text{ SR negativos}) \times 2 = 40 \text{ baciloscopias de diagnóstico}$$

$$1 \text{ caso de tuberculosis} \times 3 \text{ baciloscopias} = 3 \text{ baciloscopias de control de tratamiento}$$

Es decir que para un trimestre será necesario calcular que el stock de reactivos sea suficiente para realizar 430 baciloscopias.

Si no se prevé modificaciones en la actividad de detección de casos, el total de baciloscopias a realizar también puede ser estimado simplemente consultando el total de baciloscopias realizado durante el trimestre anterior.

Es conveniente calcular el stock necesario agregando un mes adicional de trabajo para cubrir imprevistos en la carga de trabajo o retrasos en la entrega de los insumos. En el ejemplo anterior a las 430 baciloscopias calculadas, se le sumarían 143 más, lo que hace un total de 573 baciloscopias.

	<b>Cantidad necesaria por baciloscopia a realizar</b> <b>a</b>	<b>Stock para un trimestre</b> <b>b = a x 573</b>	<b>Cantidad a solicitar (redondeo)</b>
Envase para muestras	1	573	600
Portaobjetos	1	573	600
Aplicadores	1	573	600
Papel de filtro	Un rollo por mes		
Solución de hipoclorito de sodio	0,1 ml de solución doméstica	57,3 ml	60 ml
<b>COLORACION DE ZIEHL NEELSEN</b>			
Fucsina básica (0,3%)	0,009 g ó 3 ml si recibe el colorante preparado	5,16 g ó 1719 ml	5 g ó 2 litros
Etanol 95°	5,15 ml	2951 ml	3 litros
Fenol en cristales	0,15 g	85,9 g	100 g
Ácido Clorhídrico	0,15 ml ó 5 ml si recibe el reactivo de decoloración preparado	85,9 ml ó 2865 ml	100 ml ó 3 litros
Ácido Sulfúrico	1,25 ml	716 ml	1 litro
Azul de metileno (0,1%)	0,003 g ó 3 ml si recibe el colorante preparado	1,7 g ó 1719 ml	2 g ó 2 litros
Aceite de inmersión	0,05 ml	29 ml	30 ml
Lámpara para microscopio	Una por año (sólo para microscopios ópticos con lámparas halógenas)		
<b>COLORACIÓN DE FLUORESCENCIA</b>			
Auramina O (0,1%)	0,003 g ó 3 ml si recibe el colorante preparado	1,7 g ó 1719 ml	2 g ó 2 litros
Etanol 95°	5,25 ml	3008 ml	3,5 litros
Fenol en cristales	0,09 g	51,6 g	60 g
Ácido Clorhídrico	0,025 ml ó 5 ml si recibe el reactivo de decoloración preparado	14,3 ml ó 2865 ml	15 ml ó 3 litros
Permanganato de potasio (0,5%)	0,015 g	8,6 g	10 g
Azul de metileno (0,3%)	0,009 g	5,2 g	6 g

## ANEXO III

## MICROSCOPIO

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

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

### MICROSCOPIA MEDIANTE LA COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN

#### COMPONENTES DEL MICROSCOPIO ÓPTICO



#### Parte mecánica

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

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

## Elementos ópticos y de iluminación

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

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

Por lo general, la fuente de iluminación está fijada al pie del microscopio y utiliza una bombilla de halógeno o LED, pequeña y de gran intensidad. También pueden emplearse lámparas con filamento de tungsteno. Las lámparas halógenas resisten un número limitado de horas de uso, por lo que siempre hay que tener al menos una de repuesto. Las lámparas LED tienen la ventaja de tener mayor durabilidad. La intensidad de la iluminación puede ser regulada. También tiene un diafragma (diafragma de campo) que puede ser abierto o cerrado, para dispersar o concentrar el haz luz respectivamente.

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

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

## Centrado de la iluminación (Iluminación de Kohler)

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

- Enchufar el microscopio, si se utiliza electricidad, o de lo contrario captar con el espejo la luz natural.

- Enfocar un frotis con un objetivo de poca amplificación, generalmente de 10x.

- Subir el condensador utilizando el tornillo correspondiente.

- Cerrar totalmente el diafragma de la fuente de iluminación (diafragma de campo).

- Identificar un círculo de luz al mirar por los oculares. Si el campo está totalmente oscuro, el haz de luz está muy descentrado.

- Proceder con los siguientes pasos:

- Suave y lentamente, girar los tornillos del condensador hasta que el haz de luz aparezca y /o esté centrado en el campo de observación.

- Suave y lentamente, mover la posición del condensador hacia arriba y abajo hasta encontrar la posición en la que el borde el haz de luz sea lo mas nítido posible.

- Abrir el diafragma del condensador dos terceras partes de la apertura total.

- Abrir el diafragma de la fuente de iluminación (diafragma de campo) hasta que el haz de luz alcance los bordes del campo de observación, no más que eso.

- La intensidad de la luz de la lámpara puede ser regulada según la preferencia del microscopista. También es posible agregar un filtro sobre la fuente de iluminación para suavizarla.

- Una vez centrada la iluminación, no mover ni los diafragmas ni el condensador hasta que se detecte que es necesario repetir el procedimiento porque la imagen es refringente o imprecisa. Si se opera con delicadeza el microscopio, no es necesario repetir el centrado sino después de varios días o aun meses de trabajo.

## Enfoque del microscopio óptico.

- Coloque el regulador de intensidad lumínica al mínimo.
- Encienda el microscopio y coloque el extendido.
- Coloque una gota de aceite de inmersión en el preparado cuidando que el gotero no toque la superficie del preparado para evitar transferir material de un extendido a otro y generar falsos resultados positivos.
- Enfoque la muestra en un área fuera de donde colocó el aceite de inmersión utilizando el objetivo 10x girando el ajuste grueso de mando.
- Ajuste la distancia entre los oculares hasta que tanto las imágenes a la derecha como a la izquierda se vuelvan una sola.
- Afine el foco de la imagen girando el ajuste fino.
- Cambie a 100 x. Enfoque la muestra usando el ajuste fino.
- Use sólo el objetivo de 100x para la observación con aceite de inmersión y mantenga secos el resto de los objetivos.
- Verifique si se observan “artefactos”, es decir cuerpos extraños, o BAAR que se mueven anormalmente:
  - Si los artefactos o BAAR se mueven libremente y pasan bajo la mirada del observador sin que

pueda detenerlos, pueden ser restos provenientes de otra baciloscopia que fueron arrastrados por el aceite de inmersión. Limpiar el aceite del objetivo. Verificar que no esté contaminado el aceite contenido en el frasco en uso volviendo a enfocar otro preparado con una nueva gota de aceite

- Si los artefactos se mueven cuando se desplaza el portaobjetos, pueden ser precipitados o suciedad incorporada accidentalmente en el frotis.

- Si solo se mueven cuando se gira el ocular, se trata de suciedad que está en el ocular, proceder a limpiarlo.

- Si no se mueven, la suciedad o bacilos contaminantes puede estar en los objetivos, el condensador, el espejo o la fuente de iluminación, proceder a limpiarlos.

- Lea al menos 100 campos antes de reportar un resultado negativo.

- Usualmente la observación de 100 campos lleva 5-10 minutos.

- Para ver el siguiente extendido, no se necesita realizar todos los pasos anteriores. Gire el objetivo de 100x hacia el objetivo de 10x y saque el portaobjetos, limpie el objetivo con papel suave, coloque otra gota de aceite en el siguiente portaobjetos e insértelo en la platina. Luego vuelva a su lugar el objetivo de 100x.

- Cuando haya finalizado, reduzca la intensidad lumínica al mínimo y apague el microscopio.

- Al finalizar el día limpie el objetivo con un papel suave para eliminar el resto de aceite de inmersión. Cubra el microscopio.

## MICROSCOPIA MEDIANTE LA COLORACIÓN FLUORESCENTE

Para la lectura de los extendidos teñidos con auramina, la OMS ha recomendado el uso de microscopios de fluorescencia con lámpara LED en reemplazo de los microscopios de fluorescencia convencionales con lámpara de mercurio.

Se ha demostrado que el rendimiento de estos microscopios es similar a los convencionales, pero tienen la ventaja de que su lámpara tiene una elevada vida útil (alrededor de 50.000 horas en comparación con las 200 horas estimadas para las lámparas de mercurio), genera muy poco calor y no tiene los riesgos de contaminación del ambiente en caso de rotura. Adicionalmente la calidad de la lectura es buena aun en ausencia de oscuridad total, lo cual constituye una ventaja en laboratorios de dimensiones limitadas.

Existen en el mercado microscopios con estas características, y, adicionalmente se han desarrollado adaptadores, que permiten transformar un microscopio óptico en un microscopio para fluorescencia con menor costo que el que es necesario para adquirir un microscopio de fluorescencia. Algunos de estos adaptadores, involucran la remoción de los objetivos del microscopio óptico y su reemplazo por un objetivo equipado con una lámpara LED conectada a una fuente externa de energía, de tal manera que se transforman en microscopios de fluorescencia con luz reflejada (epifluorescencia).

Otros, en cambio, involucran la instalación de una fuente de luz y un condensador en la base del equipo y un filtro barrera en la cabeza del microscopio, de tal modo que la luz excitación proviene de la parte inferior del extendido, excita el fluorocromo y luego pasa a través del objetivo al ojo del usuario (transfluorescencia).

Esta iluminación crea un fondo un poco más claro que el que se observa cuando se lee una lámina a través de un microscopio de luz reflejada. Lo ideal es que el microscopio pueda ser enfocado utilizando los objetivos 20x y 40x, ya que la estrategia recomendada para la lectura de las láminas es realizar la observación del extendido a 200x, confirmando la identificación de los bacilos en 400x.

### Enfoque del microscopio

- Coloque el extendido sobre el microscopio.
- Enfoque la muestra con el objetivo 20x girando el ajuste grueso de mando.
- Ajuste la distancia entre los oculares hasta que tanto las imágenes a la derecha como a la izquierda se vuelvan una sola.
- Afine el foco de la imagen girando el ajuste fino.
- Examine el frotis moviéndose en una línea horizontal.
- Deténgase y observe cada campo antes de moverse al siguiente.
- Lea al menos una línea empleando el objetivo 20x antes de reportar un resultado como negativo.
- Confirme las observaciones sospechosas utilizando el objetivo de 40x.
- Al finalizar la jornada, limpie la lente del objetivo y el ocular con el papel de lente.
- Cubra el instrumento con la cubierta después de su uso.

### CUIDADOS GENERALES DE LOS MICROSCOPIOS

- El microscopio debe estar ubicado siempre en



un ambiente seco (el moho puede crecer sobre las lentes), libre de polvo y sobre una superficie sin vibraciones. En áreas geográficas húmedas se recomienda emplear microscopios cuyas lentes posean tratamiento antifúngico, ya que dicho proceso ayuda a proteger las partes ópticas del equipo.

- También es conveniente que esté alejado de piletas de agua o reactivos químicos, para evitar salpicaduras o derrames.
- El aceite de inmersión debe tener una viscosidad media y un índice de refracción mayor a 1,5 (no usar aceite de cedro ya que los residuos quedan adheridos a las lentes).
- Para el caso de la microscopía de ZN, no retirar las láminas sin cambiar el objetivo de 100x por el de 10x, para evitar rayar las lentes.
- Al terminar las lecturas del día, cubrir el microscopio con su funda.
- Si no está en uso, guardarlo en una caja con gel de sílice; cuando el gel cambie su color de celeste a rosa se ha humedecido, debe ser restaurado calentándolo en estufa con atmósfera seca. También puede ser guardado en una caja acondicionada con una lámpara de 25 W como máximo, que, al mantenerse encendida, genera un ambiente seco.
- Limpiar con papel para lentes o pañuelos de papel suave la óptica del microscopio. No utilizar solventes (alcohol, xileno, benceno, acetona) para limpiar los objetivos. Estos solventes pueden disolver los pegamentos de las lentes y permitir que el aceite de inmersión penetre en ellas.
- Sólo cuando se observen huellas o manchas de

grasa sobre las lentes, emplear la solución de limpieza recomendada por el fabricante.

- Para la limpieza de los oculares: soplar con una pera para eliminar el exceso de polvo. Limpiar los oculares con un hisopo de algodón embebido en solución de limpieza de modo circular de adentro hacia afuera. Luego, secar los oculares con papel suave.
- Para la limpieza de los objetivos: soplar con una pera para eliminar el exceso de polvo. Humedecer el papel de la lente con la solución de limpieza y limpiar suavemente con un movimiento circular de adentro hacia afuera. Luego limpiar con papel suave.
- El mantenimiento preventivo debe ser programado para interferir lo mínimo posible con el trabajo de rutina. El correctivo (reparaciones y reemplazo de piezas dañadas del microscopio) es eventual y debe ser realizado por personal especializado.

## MODELOS DE FORMULARIOS

### Formularios de solicitud de análisis de TB en muestras biológicas.

Se presentan a continuación dos modelos de formularios, uno preparado para laboratorios que realizan coloración de ZN y el otro para los que realizan coloración con auramina.

Solicitud de análisis de TB en muestras biológicas								
Servicio solicitante:.....				Fecha de solicitud:.....				
Nombre del paciente:.....								
Edad (años):.....			Fecha de nacimiento:.....		Sexo: Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/>			
Dirección del paciente:.....								
.....						Teléfono:.....		
Razón del análisis:								
<input type="checkbox"/> Diagnóstico.		¿Si es diagnóstico presuntivo de TB RR/MR? <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No						
<input type="checkbox"/> Seguimiento.		Si es de seguimiento, mes de tratamiento:.....						
¿Infección VIH?				<input type="checkbox"/> Si		<input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Desconocido
¿Previamente tratado para TB?				<input type="checkbox"/> Si		<input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Desconocido
Tipo de muestra:				<input type="checkbox"/> Espudo <input type="checkbox"/> Otro (especifique):.....				
Prueba(s) solicitada:				<input type="checkbox"/> Microscopía <input type="checkbox"/> Xpert MTB/RIF <input type="checkbox"/> Cultivo <input type="checkbox"/> Sensibilidad a medicamentos <input type="checkbox"/> Pruebas por sondas genéticas				
Solicitado por (Nombre y firma).....								
.....								
Resultados de Microscopía (Coloración del Ziehl Neelsen)(para ser completado en el laboratorio)								
Fecha de recolección de muestra (llenada por el solicitante)	Tipo de muestra	Numero (s) de registro de laboratorio	Aspecto visual (sanguinolento mucopurulento o saliva)	Resultado (marque uno)				
				No se observan BAAR	1-9 BAAR/100 campos (Reportar Nº de BAAR)	Pos(+)	Pos(++)	Pos(+++)
Examinado por (nombre y firma);.....								
Fecha del resultado:.....								

**Solicitud de análisis de TB en muestras biológicas**

Servicio solicitante:..... Fecha de solicitud:.....

Nombre del paciente:.....

Edad (años):.....Fecha de nacimiento:..... Sexo: Masculino  Femenino

Dirección del paciente:.....

..... Teléfono:.....

Razón del análisis:

Diagnóstico. ¿Si es diagnóstico presuntivo de TB RR/MR? Si  No

Seguimiento. Si es de seguimiento, mes de tratamiento:.....

¿Infección VIH?  Si  No  Desconocido

¿Previamente tratado para TB?  Si  No  Desconocido

Tipo de muestra:  Esputo  Otro (especifique):.....

Prueba(s) solicitada:  Microscopía  Xpert MTB/RIF

Cultivo  Sensibilidad a medicamentos

Pruebas por sondas genéticas

Solicitado por (Nombre y firma).....

.....

**Resultados de Microscopía (Coloración de auramina)(para ser completado en el laboratorio)**

Fecha de recolección de muestra (llenada por el solicitante)	Tipo de muestra	Número (s) de registro de laboratorio	Aspecto visual (sanguinolento mucopurulento o saliva)	Resultado (marque uno)					
				No se observan BAAR	Se requiere confirmación (*)	Pos (Escasos)	Pos(+)	Pos(++)	Pos(+++)

(\*) Remitir nueva muestra

Examinado por (nombre y firma);.....

Fecha del resultado:.....

## Instructivo de los formularios de solicitud de análisis de TB en muestras biológicas

- Servicio solicitante: Nombre y dirección del servicio público o privado que envía la muestra (hospital, centro de salud, sistema penitenciario, seguro social, clínica, sanatorio, otro).
- Fecha de solicitud: Día, mes y año en que se solicita el estudio.
- Nombre del paciente: Los que constan en el documento de identidad.
- Edad: Años cumplidos al momento de la solicitud de la muestra.
- Fecha de nacimiento: La que figura en el documento de identidad.
- Sexo: Marcar una cruz en M= Masculino o F= Femenino según corresponda.
- Dirección del paciente: Calle y número de residencia del paciente. Si se encuentra en una unidad carcelaria u otra institución cerrada, indicar nombre y ubicación.
- Teléfono: Fijo y/o celular con código de área.

### Razón del análisis

- Diagnóstico: Marcar una cruz si la muestra es para diagnóstico.
- Si es diagnóstico presuntivo de TB Resistente a Rifampicina/Multirresistente (TB RR/MR): Marcar con una cruz en Si o No según corresponda.
- Seguimiento: Marcar una cruz si se trata de una muestra para control del tratamiento.
- Si es seguimiento, mes de tratamiento: Escribir

el número del mes de tratamiento al que corresponde la muestra.

- Infección VIH: Marcar con una cruz en el casillero correspondiente, según el estado de VIH al momento del diagnóstico. Si = Si infección por VIH, No= No infección por VIH , Desconocido= Estado de VIH desconocido.
- Previamente tratado para TB Marcar una cruz en el casillero SI = Si el paciente recibió tratamiento completo o incompleto (por más de 30 días) para tuberculosis con anterioridad a la solicitud de la muestra. NO = Si el paciente no recibió tratamiento antituberculoso previo a la solicitud de la muestra o Desconocido = Estado de tratamiento previo desconocido.
- Tipo de Muestra de: Marcar en el casillero correspondiente a esputo, Si = Si se trata de ese tipo de muestra. Si fuera otra, marcar en el casillero correspondiente y nombrar el tipo de muestra para la que se solicita el estudio bacteriológico.
- Prueba solicitada: Marcar en microscopía, Xpert MTB/RIF, cultivo, sensibilidad a medicamentos y/o sistema de hibridación en tiras, según corresponda.
- Solicitado por: Indicar el nombre del personal de salud responsable de la solicitud. Firmar el pedido

### Resultado de la microscopía (para ser completado en el laboratorio)

- Fecha de recolección de la muestra: El solicitante del estudio debe colocar la fecha en que se recolectó/aron la/s muestra/s.
- Tipo de muestra: Indicar el tipo de muestra estudiado según conste en la parte superior del formulario
- Número/s de registro/s de laboratorio: indicar

el n° que le corresponde a cada muestra en el registro de laboratorio

- Aspecto visual: Si se trata de una muestra de esputo, indicar si su aspecto es mucopurulento, sanguinolento o saliva.
- Resultado: Marcar el resultado obtenido para cada muestra de acuerdo a la coloración realizada y a la escala normada para la Red Nacional de Laboratorios de Bacteriología de la Tuberculosis
- Examinado por: Nombre, apellido y firma de la persona que realizó el examen microscópico.
- Fecha del resultado: Día, mes y año en que se confeccionó el informe.

Registro de laboratorio para baciloscopia y Xper MTB/RIF															
N° de registro	Fecha de recepción de la muestra	Nombre del Paciente	Edad/Fecha de Nacimiento	Dirección del paciente	Tipo de muestra	Infección VH (S/N/Desc) (a)	Paciente previamente tratado (b)	Tipo de examen (marque una opción)		Resultado del Examen			Observaciones (f)		
								Diagnóstico	Seguimiento	Xpert (d)	Baciloscopia (e)				
									Mes (c)	Fecha	1	2	Otra Fecha		

**(a)** S = Si; N = No; Desc = desconocido

**(b)** S = previamente tratado; N = no previamente tratado; Desc = desconocido

**(c)** Paciente en tratamiento; indicar el mes de tratamiento en el cual se realiza el examen de seguimiento.

**(d)** El resultado de la prueba de Xpert MTB/RIF se reporta como sigue:

*T = MTB detectado, Resistencia a rifampicina no detectada*

*RR = MTB detectado, Resistencia a rifampicina detectada*

*TI = MTB detectado, Resistencia a rifampicina indeterminada*

*N = MTB no detectado*

*I = No válido / sin resultados / error*

Si se emplea la prueba Xpert MTB/Ultra RIF el reporte debe ser efectuado como sigue,

*T = MTB detectado, Resistencia a rifampicina no detectada*

*RR = MTB detectado, Resistencia a rifampicina detectada*

*TI = MTB detectado, Resistencia a rifampicina indeterminada*

*TT = MTB detectado (trazas), Resistencia a rifampicina indeterminada*

*N = MTB no detectado*

*I = No válido / sin resultados / error*

### **(e) Resultado de Baciloscopia**

Si la baciloscopia fue realizada por el método de Ziehl Neelsen, se reporta como sigue:

*Neg = 0 BAAR*

*1 a 9 BAAR/100 campos = número exacto de BAAR*

*10 a 99 BAAR/100 campos = +*

*1 a 10 BAAR/campo = ++*

*>10 BAAR/campo = +++*

Si la baciloscopia fue realizada por el método de auramina, se reporta como sigue

#### **Lectura a 200x de amplificación**

*Neg = 0 BAAR*

*1 a 4 BAAR/línea = confirmar*

*5 a 49 BAAR /línea= Escasos*

*3 a 24 BAAR/ campo = +*

*25 a 250 BAAR/campo = ++*

*>250 BAAR/campo = +++*

#### **Lectura a 400x de amplificación**

*Neg = 0 BAAR*

*1 a 2 BAAR/línea = confirmar*

*3 a 24 BAAR /línea= Escasos*

*1 a 6 BAAR/ campo = +*

*7 a 60 BAAR/campo = ++*

*>60 BAAR/campo = +++*

**(f)** Si el resultado del Xpert MTB/RIF es indeterminado (I), indicar código de error o "No válido". Este espacio puede reservarse para registrar la fecha en que se envía la muestra al laboratorio de referencia si procede.





## 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 1	Cristales o precipitados 2	Coloración fondo 1	Lectura	Cristales o precipitados 2		Coloración fondo 1	

**Notas:**

- 1 Consignar buena o mala
- 2 Consignar sí o no

