




**E.S.E.**  
**RAFAEL TOVAR POVEDA**  
NIT. 900211477-1

# MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

**SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD**  
Bajo la Norma Técnica de Calidad en la  
Gestión Pública NTCGP 1000:2009.

Aprobado por Resolución 1150 de 2020.

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 1 de 31

## TABLA DE CONTENIDO

### **SE ADOPTA EL MANUAL DE LA ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD**

#### **1. OBJETIVOS**

#### **2. INTRODUCCIÓN**

#### **3. MARCO TEÓRICO**

##### **3.1 LA MUESTRA**

###### **3.1.1 El Esputo**

###### **3.1.2 Número de muestras y momento de la recolección**

###### **3.1.3 Muestra Para control de tratamiento El tratamiento de la tuberculosis**

###### **3.1.4 Obtención espontánea del esputo**

###### **3.1.5 Calidad de la muestra**

###### **3.1.6 Métodos especiales para obtener muestras de esputo**

###### **3.1.6.1 Lavado gástrico**

##### **3.2 RECEPCIÓN DE LOS PACIENTES**

##### **3.3 CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS**

##### **3.4 TRANSPORTE DE MUESTRAS**

##### **3.5 LA BACILOSCOPIA**

###### **3.5.1 Lugar de trabajo y materiales**

###### **3.5.2 Preparación y fijación del extendido**

###### **3.5.3 Tinción**

###### **3.5.3.1 La técnica de Ziehl Neelsen Coloración**

##### **3.6 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA Y LECTURA DE EXTENDIDOS**

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

###### **3.6.2 Lectura de extendidos coloreados por Ziehl Neelsen**

###### **3.6.3 Informe de los resultados**

##### **3.7 DESCONTAMINACIÓN Y DESECHO DEL MATERIAL**

##### **3.8 DERIVACIÓN DE MUESTRAS PARA CULTIVO**

##### **3.9 CONTROL DE CALIDAD DE LAS BACILOSCOPIAS**

###### **3.9.1 Control de colorantes y microscopios**

#### **4. CULTIVOS PARA TUBERCULOSIS**

##### **4.1 Persistencia del bacilo en muestras de la lesión**

##### **4.2 Resistencia del bacilo a agentes descontaminantes**

##### **4.3 Exigencias para el desarrollo del bacilo in vitro**

##### **4.4 Toma, recepción, conservación y transporte de las muestras para cultivar**

##### **4.5 Procedimiento para realizar cultivos en Kudoh Ogawa**


##### **4.6 Control visual periódico**

##### **4.7 Registro de resultados**

##### **4.8 Descarte de tubos inoculados**

#### **5. BIBLIOGRAFÍAS**

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 2 de 31

## 1. OBJETIVO

Cortar la cadena de transmisión, diagnosticando tempranamente los casos infectantes y tratándolos con esquemas eficaces hasta lograr su curación.

## 2. 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 solución del problema para los enfermos y, fundamentalmente, para este problema de salud pública

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

El diagnóstico de certeza de tuberculosis puede hacerse en forma confiable en el laboratorio demostrando la presencia de bacilos en una muestra de la lesión por medio de la baciloscopia (examen microscópico) o el cultivo.

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

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

## 3. MARCO TEÓRICO

### 3.1 LA MUESTRA

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

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

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

### 3.1.1 EL ESPUTO

El envase Debe tener las siguientes características:

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




### 3.1.2 Número de muestras y momento de la recolección

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

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

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 4 de 31

**concorre a entregar la segunda.** También puede ser recolectada por el paciente al despertar en su casa. La obtención de la muestra en el momento de la consulta inicial asegura que se pueda realizar al menos una baciloscopia del SR. Sin embargo, es más probable que se eliminen bacilos en las muestras matinales, por lo que deben hacerse los mayores esfuerzos para que la persona regrese con otra(s) muestra(s).

### 3.1.3 Muestra Para control de tratamiento El tratamiento de la tuberculosis comprende dos fases:

Una inicial intensiva que dura entre 2 y 3 meses y otra de consolidación que dura de 4 a 5 meses, dependiendo de la categoría del paciente y del esquema adoptado. La disminución paulatina y sostenida en la escala de positividad hasta la negativización de la baciloscopia evidencia buena evolución del paciente

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


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

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

### 3.1.4 Obtención espontánea del esputo

- ❖ El primer paso para asegurar la calidad de la baciloscopia consiste en explicar al SR, con mucha claridad, la importancia de examinar muestras de esputo, la necesidad de recolectar esputo y no saliva, la forma de lograr una buena muestra, dónde colectarla y cómo manipularla hasta entregarla en el laboratorio Para la recolección de las muestras.
- ❖ Elegir un lugar bien ventilado y que ofrezca privacidad. Puede ser una habitación bien ventilada y con acceso de luz natural (sol) o algún lugar abierto no concurrido del patio del Servicio de Salud. Son inadecuados los lugares cerrados o muy concurridos tales como laboratorios, consultorios médicos, salas de espera o baños, ya que éste es el proceso más riesgoso entre todos los necesarios para realizar la baciloscopia.

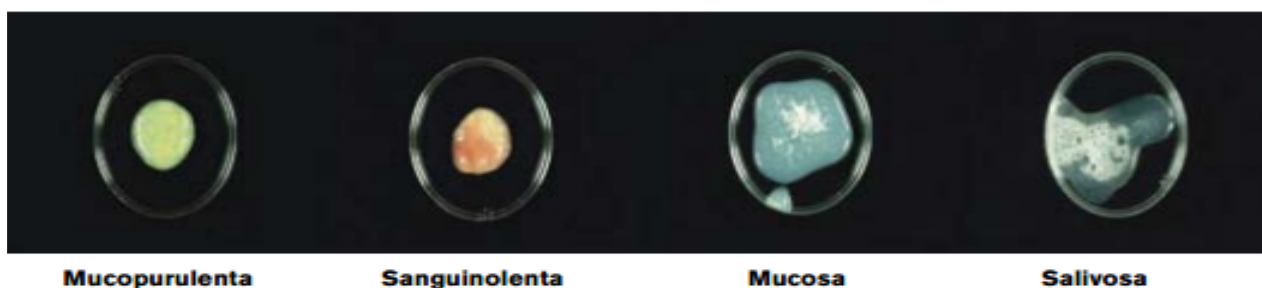
ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 5 de 31

- ❖ Entregar al SR el envase de recolección ya rotulado con su nombre o número de identificación y el servicio que solicita la baciloscopia. Estos datos deben ser escritos en la pared del frasco y no en la tapa para evitar errores, con rótulos que no se despeguen o con lápiz indeleble.
- ❖ Solicitar al SR una buena muestra de esputo utilizando la palabra que lo identifica en cada lugar (gallo, pollo, gargajo, del fondo del pecho, etc), instruyéndolo con lenguaje simple y comprensible para que
  - inspire profundamente llenando sus pulmones de aire tanto como sea posible
  - retenga el aire un momento
  - expulse luego la expectoración con un esfuerzo de tos, tratando de arrastrar las secreciones del pulmón
  - recoja el esputo producido dentro del envase tratando de que entre en su totalidad, sin manchar sus manos o las paredes externas del frasco
  - repita esta operación otras dos veces colocando todas las secreciones en el mismo frasco
  - limpie el exterior del envase con un pañuelo de papel y se lave las manos con agua y jabón.

### 3.1.5 Calidad de la muestra


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



### 3.1.6 Métodos especiales para obtener muestras de esputo

Siempre se debe intentar conseguir expectoración espontánea porque produce la muestra con mayor riqueza en bacilos. Frente a determinados pacientes que no pueden expectorar, como en el caso de niños, enfermos psiquiátricos o ancianos, se puede recurrir a otras formas menos eficientes de obtención de la muestra tales como la inducción de esputo o el lavado gástrico. Estos procedimientos requieren equipo y medidas especiales de bioseguridad, y deben ser efectuadas por personal experimentado. Inducción de esputo Consiste en fluidificar las secreciones mediante nebulización con solución fisiológica y facilitar luego su drenaje. El procedimiento requiere de personal muy bien entrenado y, en el caso de aplicar masaje y sondas, muy especializado. Implica

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 6 de 31

riesgo elevado para el personal que asiste al paciente, por lo que debe ser utilizado sólo cuando no queda otro recurso.

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

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

### 3.1.6.1 Lavado gástrico

Se emplea especialmente en niños que no saben expectorar para detectar bacilos en el esputo ingerido, mientras se encuentran en el estómago. La baciloscopia de lavado gástrico tiene valor relativo. Por un lado, los pacientes infantiles presentan lesiones que contienen pocos bacilos y por lo tanto es poco probable detectarlos. Por otro, es posible que la muestra contenga micobacterias ambientales provenientes de alimentos que pueden inducir a resultados falsos positivos. Se recomienda utilizar esta muestra sólo para diagnóstico y no en el control del tratamiento. Estas muestras deben ser obtenidas por personal de enfermería experimentado, o por médicos. Para evitar demoras en el procesamiento, la toma de estas muestras debe ser programada en conjunto con el personal del laboratorio. Se deben respetar las siguientes recomendaciones:

- ❖ Número de muestras: al menos tres.
- ❖ Envase: el aconsejado para esputo.
- ❖ Momento de la recolección: por la mañana al despertar, en ayunas dado que la ingesta de alimentos hace que la expectoración ingerida
- ❖ pase al intestino. El ayuno no debe ser demasiado prolongado y no debe haber estímulo alimenticio que aumente la acidez gástrica (por ejemplo, por presencia de la madre ante los lactantes),
- ❖ Técnica: Se introduce una sonda de longitud y diámetro adecuados a la edad del paciente hasta el estómago. Una vez que la sonda llega al estómago, se aspira con jeringa muy

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente



suavemente para que la succión no provoque daño. En caso de no obtenerse material, se inoculan 10 a 15 ml de agua destilada o solución fisiológica estéril y se recoge el contenido gástrico inmediatamente después, en un frasco de tamaño adecuado.

- ❖ **Conservación:** El material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio, ya que debe ser cultivado durante las 4 horas siguientes a su obtención. Si, excepcionalmente, no es posible el procesamiento inmediato debe neutralizarse el material con 1 mg de bicarbonato de sodio o de fosfato trisódico anhidro por cada ml de contenido gástrico, y conservarse en heladera por no más de 24 horas.
- ❖ **Procesamiento:** las muestras de lavado gástrico deben cultivarse. La baciloscopia se realiza con el sedimento de la muestra centrifugada previamente durante 30 minutos a 3.000 g, por lo que es conveniente que sea hecha directamente en el laboratorio que cultiva la muestra.

### 3.2 Recepción de los pacientes


La recepción de los pacientes que entregan sus muestras debe ser organizada en un lugar de la unidad de salud ventilado o donde el aire sea renovado por algún sistema. Debe ser ágil de tal manera que el paciente no espere. Debe tenerse en cuenta que la permanencia prolongada de pacientes que están expectorando bacilos en una sala de espera genera riesgo de transmisión de la tuberculosis en el centro de salud a otros pacientes y al personal. Para facilitar la identificación oportuna de los casos de tuberculosis las muestras de esputo producidas por los SR deben poder ser colectadas y entregadas en cualquier hora del día, en el momento más adecuado para el paciente mientras el centro de salud esté abierto. El laboratorio debe recibir las muestras durante toda la jornada de atención a los pacientes. Luego puede regular el momento en que las procesa ya que el esputo puede conservarse unos días, sobre todo si sólo va a ser examinado por baciloscopia. Aun así, el examen debe ser realizado con la mayor premura posible, dentro de una rutina lógica de trabajo. En el momento de recibir la muestra, se deben completar los siguientes procedimientos:

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

Si el paciente no obtuvo esputo y devuelve el envase, también ubicar el envase dentro de la caja para que luego sea desechado con el material contaminado como si hubiera sido usado. Después de recibida la muestra es necesario agilizar los procedimientos en todo lo posible. Cuanto antes se procese, mayor será la posibilidad de encontrar en ella M. tuberculosis por baciloscopia o cultivo. La temperatura ambiente y el transcurso del tiempo favorecen la multiplicación de los gérmenes habituales del árbol respiratorio y de la boca que desnaturalizan las proteínas del esputo, dificultan la elección de la partícula útil y favorecen la destrucción del bacilo. La multiplicación de la flora habitual o contaminante de las muestras de orina o contenido gástrico aumenta la posibilidad de que el cultivo resulte contaminado.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente



 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 8 de 31

### 3.3 CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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

### 3.4 TRANSPORTE

Cuando el servicio de salud no cuenta con laboratorio, su personal debe conocer a qué laboratorio debe enviar las muestras, cuándo y cómo. Tanto para baciloscopia como para cultivo es recomendable que el transporte debe establecer los días de la semana en los que se efectuarán regularmente los envíos, el medio de transporte y el horario de salida y de llegada. Si los envíos no se hacen regularmente es conveniente que el laboratorio que va a recibir las muestras sea advertido previamente.

Mínimamente deben considerarse dos condiciones importantes:


- ❖ Protección del calor excesivo y de la luz solar
- ❖ Eliminación del riesgo de derrame. Se puede utilizar para el transporte una caja de metal o una de plástico opaco, con algún mecanismo que trabaje su tapa, y con una manija para facilitar su acarreo, como las que son utilizadas para trasladar material refrigerado o herramientas

### Recepción en el laboratorio que hace la baciloscopia

El personal del laboratorio que recibe las muestras debe:

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

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 9 de 31

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

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

#### ENCAUZAR PARA CULTIVO

Las muestras recibidas para diagnóstico en extrapulmonares, de niños, de inmunosuprimidos, particularmente HIV positivos y de lavado gástrico, lavado bronquial o hisopados, de pacientes con antecedentes de tratamiento antituberculoso, especialmente si se registró abandono o fracaso y de pacientes con exposición a infección por bacilos resistentes a las drogas (contactos de casos con tuberculosis resistente, internados o trabajadores de instituciones de salud o de prisiones donde se registran casos con tuberculosis multiresistente)

Las muestras recibidas para control de tratamiento de casos con

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

### 3.5 LA BACILOSCOPIA

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

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

La coloración de Ziehl-Neelsen es la técnica más apropiada para ser utilizada en todos los laboratorios de los países de América Latina.

#### 3.5.1 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.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

Deben seguirse normas básicas sencillas que aseguren calidad y minimicen los riesgos. Es recomendable que el área de trabajo sea exclusiva, pero no siempre es posible. Si se debe compartir un área del laboratorio, es necesario escoger un sitio preferentemente alejado de la entrada, para evitar corrientes de aire y movimiento de personal alrededor durante el procesamiento de las muestras. También es muy recomendable realizar los extendidos y coloraciones en un horario especial, en el momento de menor trabajo en el laboratorio. Los requisitos mínimos del laboratorio son:

Los requisitos mínimos del laboratorio son:

-Buena iluminación.

-Ventanas o extractor para renovar el aire una vez finalizado el trabajo.

-Paredes y pisos lavables, que puedan ser desinfectados con solución de hipoclorito de sodio  
Una mesa o mesada para colocar las muestras que se reciban y realizar los extendidos, con dimensiones mínimas de 1 x 0,50 m, en lo posible cubierta con material liso y resistente a soluciones germicidas (fórmica, acero inoxidable o materiales similares). En caso de no contar con este tipo de mesada se puede utilizar bandejas o cubrir la mesa con un vidrio o papel.

- Un lavabo con fuente de agua y desagüe, en el que se pueda lavar las manos y realizar la tinción.

-Una repisa o armario para los reactivos, portaobjetos y demás materiales.

-Una mesa para el microscopio.

-Una mesa para escribir los informes y los registros del laboratorio



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


-Dos batas o guardapolvos de uso exclusivo para cada persona que realice baciloscopia.

-Microscopio con objetivo de inmersión en buenas condiciones, con una lámpara de repuesto. En el caso de realizarse la técnica de fluorescencia es necesario, además, un microscopio de fluorescencia con oculares de 40x.

-Envases para recolección de muestras.

-Aplicadores de madera o caña/bambú.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 11 de 31


- Láminas portaobjetos nuevas, limpiadas con alcohol y secadas al aire.
- Fracos color ámbar para soluciones colorantes.
- Un soporte para sostener 12 láminas portaobjetos durante la preparación de extendidos.
- Varillas de vidrio u otro soporte inoxidable, de dimensiones adecuadas para sostener 12 láminas portaobjetos durante la tinción
- Un mechero, preferentemente de gas, aunque puede utilizarse uno de alcohol
- Lápiz marcador de vidrio: graso o de tinta indeleble (que no sea de color rojo para evitar errores), con punta de diamante, de los que se utilizan para marcar cerámicas
- Papel de filtro. - Papel para limpieza de lentes, pueden ser pañuelos de papel desechables.
- Una pinza.
- Un hisopo.
- Un recipiente para descartar los envases con muestras, con tapa, de material resistente al autoclavado e inoxidable o que contenga una bolsa roja para residuos patológicos.
- Aceite de inmersión: se recomienda no utilizar aceite de cedro, sino aceites a base de hidrocarburos sintéticos o de polímeros con índice de refracción de 1,5 debido a que no se secan, no se endurecen y no son disolventes de la fucsina
- Etanol al 70% o xilol
- Soluciones antisépticas: fenol al 5% hipoclorito de sodio al 1%.

### 3.5.2 Preparación y fijación del extendido

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

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

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 12 de 31

-Ordenar las muestras según su número.

-Para cada muestra, numerar una lámina portaobjetos, siempre en el mismo borde. Debe ser el mismo número asignado en el Registro del laboratorio, en el formulario de la orden de examen y en las paredes del envase que contiene la muestra. Si se utiliza lápiz graso, escribir el número en la cara inferior del portaobjetos para evitar que se borre durante la tinción. No tocar con los dedos la parte del portaobjetos destinada al extendido.

-Disponer las muestras a la izquierda del operador, o a la derecha, siempre en la misma posición, en orden creciente de numeración. Ubicar cada lámina marcada delante de la muestra que le corresponde.

-Usar una lámina para cada muestra. No colocar extendidos de más de una muestra en una lámina.

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

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

-Destapar con cuidado el envase.

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


-Tomar una parte del aplicador con la mano izquierda y la otra con la derecha, entre el pulgar y el índice, y con los extremos irregulares seleccionar la partícula más densa o purulenta de la muestra de esputo. Enrollarla en una de las 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.

-Colocar la(s) partícula(s) seleccionada(s) sobre el portaobjetos y extenderla(s) con el aplicador con movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un círculo u óvalo de 2 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla. Verificar que el extendido tenga grosor homogéneo y adecuado. Si es demasiado fino, es posible producir un resultado falso negativo. Si es muy grueso, el material puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos debajo de una capa gruesa de mucus. Se puede adquirir entrenamiento poniendo un papel impreso debajo del extendido. El grosor adecuado es el que permite ver, pero no leer un texto impreso a través del preparado. Una vez adquirido el entrenamiento, es preferible no repetir rutinariamente este proceso para evitar tocar y transferir muestras con los papeles impresos.

-Dejar el extendido en un soporte ubicado al costado de la mesada para que se seque a temperatura ambiente. El extendido no debe ser calentado a la llama mientras esté húmedo pues el calor fuerte altera la estructura de los bacilos y su posterior tinción; además puede generar aerosoles.

-Desechar el aplicador en un frasco que contenga una solución de hipoclorito de sodio al 1%; este frasco irá al autoclave o directamente a incineración.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 13 de 31

-Cerrar el envase de la muestra con la que se realizó el extendido y dejarlo en el lado opuesto al lugar donde están los frascos con las muestras que aún no se han procesado, para evitar confusiones.

-Continuar de la misma manera con cada una de las muestras siguientes.

-Conservar las muestras hasta terminar las lecturas de la baciloscopia y verificar que no es necesario realizar nuevos extendidos o enviarlas para cultivo.

-Limpiar la superficie de trabajo con una toalla de papel o algodón empapado en hipoclorito de sodio al 1% para desinfectarla.

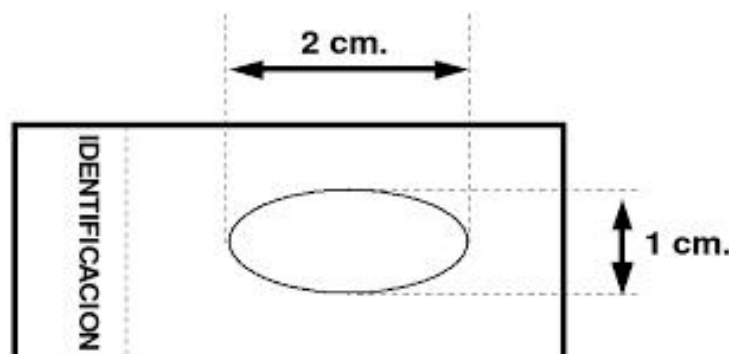
-Descartar los guantes desechables, junto con las muestras en el recipiente destinado a este fin. Si se trata de guantes de uso doméstico, sumergir las manos enguantadas en solución de hipoclorito de sodio 1% antes de quitárselos

-Esperar a que las láminas se hayan secado al aire.

-Tomar de a uno cada extendido con una pinza manteniendo la cara que contiene la muestra hacia arriba, y pasarlos rápidamente sobre la llama de un mechero tres o cuatro veces cuidando que no se caliente demasiado.

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

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



ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

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

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>APROBÓ</b>
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

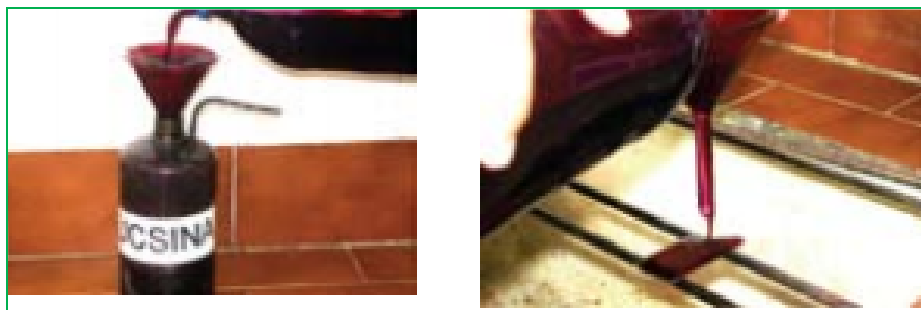


### 3.5.3 Tinción

#### 3.5.3.1 La técnica de Ziehl Neelsen Coloración

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

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



-Colocar sobre el soporte las láminas fijadas conservando el orden numérico con el extendido hacia arriba y manteniendo una separación de al menos 1 cm entre ellas.

-Cubrir totalmente la superficie del extendido con fucsina básica fenicada recién filtrada. Dispensar el colorante con suavidad, sin salpicar y sin tocar con el gotero o con el embudo los extendidos

-Con la llama de un hisopo embebido en alcohol calentar suavemente por debajo de los extendidos, con movimientos de vaivén, hasta que observe que se desprenden los primeros vapores blancos. No calentar con mechero.

-En caso de derrame del colorante, reponer la fucsina, no dejar secar el preparado.

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


-Con una pinza, levantar cuidadosamente la lámina portaobjetos desde el extremo más cercano al operador. Enjuagar con abundante agua a baja presión, con un frasco o un grifo. Lavar muy suave y cuidadosamente la superficie eliminando totalmente la solución de fucsina. Girar el extendido y lavar con cuidado también la parte posterior.

-Inclinar el portaobjetos para eliminar el exceso de agua y así evitar diluir los reactivos que se utilizarán a continuación

#### **Decoloración**

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

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 16 de 31

-Enjuagar con abundante agua a baja presión.

-Verificar que el extendido se ha decolorado (las partes más gruesas del extendido a lo sumo conservan un leve tinte rosado). Si se observan cúmulos rojos o coloración rosada intensa, volver a cubrir con solución decolorante, dejarla actuar entre uno y tres minutos y enjuagar nuevamente.

-Eliminar el exceso de agua inclinando el portaobjetos

### **Coloración de fondo**

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


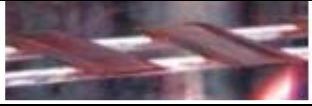


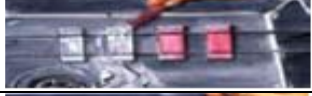



-Dejar actuar durante un minuto.

-Enjuagar las láminas en ambas caras con agua a baja presión y limpiar la parte inferior con un algodón si ha quedado coloreada.

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

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

### **TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN**

	CUBRIR CON FUCSINA FILTRADA
	CALENTAR HASTA EMISIÓN DE VAPORES TRES VECES DURANTE 5 MINUTOS
	LAVAR CON AGUA
	CUBRIR CON DECOLORANTE DURANTE 3 MINUTOS
	LAVAR CON AGUA
	CUBRIR CON AZUL DE METILENO DURANTE 1 MINUTO
	LAVAR CON AGUA
	SECAR AL AIRE

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

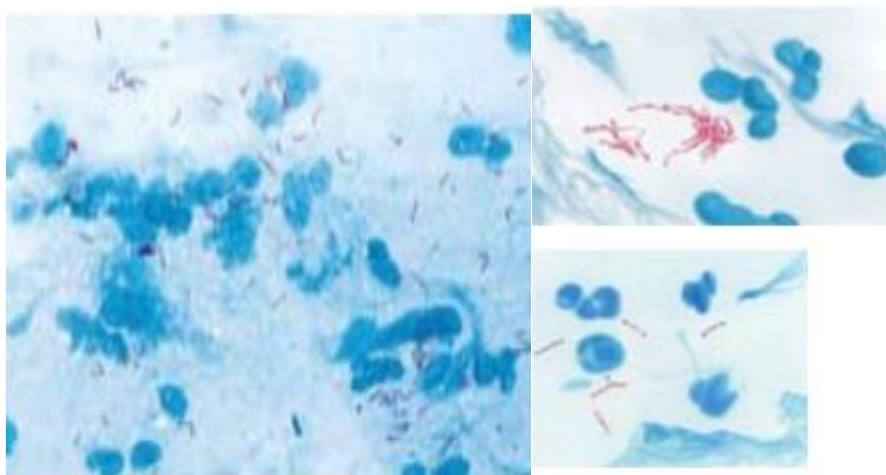
### 3.6 OBSERVACION MICROSCÓPICA Y LECTURA DE EXTENDIDOS

La observación microscópica debe cumplir principalmente dos objetivos:

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

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

Los bacilos acidorresistentes tienen entre 1 y 10  $\mu\text{m}$  de largo. Con la coloración de Ziehl Neelsen se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, rojo fucsia, destacándose claramente contra el fondo azul. En los extendidos teñidos con auramina los bastoncitos se observan con fluorescencia amarilla. A veces se observan con gránulos o cuentas intensamente coloreados en el interior. En 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 poco frecuente encontrar más de 10 microorganismos ácidos alcoholes 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.

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

Ubicar cerca del microscopio todos los elementos necesarios:

- aceite de inmersión
- pañuelos o trozos de papel suave
- el Registro del Laboratorio
- una lapicera
- una caja para guardar portaobjetos
- un frasco con xilol o con etanol a 70%.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

### Lectura

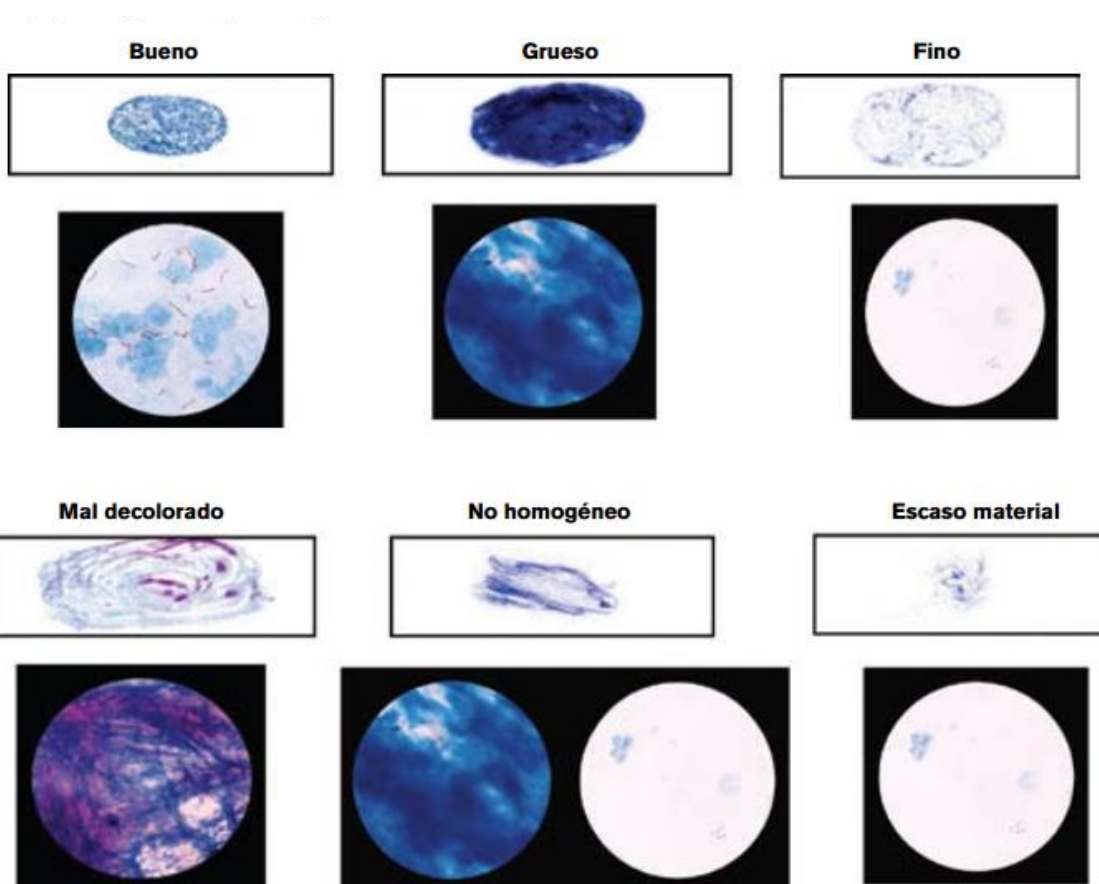
Depositar una gota de aceite de inmersión en un extremo del frotis, sin tocar el preparado con el gotero.

Enfocar el extendido donde ha colocado la gota de aceite, con la lente 100x de inmersión (ver Anexo III)


Observar cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el tornillo micrométrico, antes de desplazarse al campo contiguo.

Seguir un recorrido en líneas rectas, sistemático para recorrer el extendido evitando repetir la lectura de algunos campos. Ej: de izquierda a derecha:

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



ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	<b>Código: AS-ADT-LC-M04</b>
		<b>Versión: 01</b>
		<b>Fecha de vigencia: 01/06/2020</b>
		<b>Página 19 de 31</b>

Si se observan anomalías, identificar las causas:

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

-Si se observan cuerpos extraños (artefactos) que se mueven cuando se desplaza el portaobjetos, pueden ser restos de alimentos, precipitados o cristales. Si sólo se mueven cuando se gira el ocular, se trata de suciedad que está en el ocular y hay que proceder a limpiarlo.

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

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


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

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

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

-Para calcular el promedio de BAAR encontrados por campo, sumar el total de BAAR contados y dividir ese total por el número de campos observados. Cuando los bacilos se presentan agrupados, una estimación aproximada del número de bacilos presentes en el cúmulo es suficiente para calcular este promedio.

<b>ELABORÓ</b>	<b>REVISÓ</b>	<b>APROBÓ</b>
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 20 de 31

-Los campos leídos deben ser “campos microscópicos útiles”. Se considera campo microscópico útil a aquel en el cual se observan células bronquiales (leucocitos, células ciliadas) o fibras mucosas, que aparecen teñidos de azul. Los campos sin estos elementos no deben ser considerados para contar el total de campos observados, a menos que contengan BAAR.

-El extendido preparado tal como fue descrito permite observar 100 campos microscópicos en línea recta. Puede ser necesario leer una segunda línea para encontrar los 100 campos útiles.

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

-Al finalizar la lectura, girar el revolver de los objetivos y retirar el portaobjetos de la platina

-Comprobar el número de identificación y registrar el resultado.

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

### 3.6.3 Informe de los resultados

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


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

El informe utilizando la escala semicuantitativa estandarizada asegura la reproducibilidad de los resultados y permite evaluar

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

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente



 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 21 de 31

Registrar inmediatamente el resultado de la lectura en el Registro del Laboratorio. Marcar los resultados positivos en rojo, para identificarlos rápidamente.

### 3.7 DESCONTAMINACION Y DESECHO DEL MATERIAL

-Desechar las muestras colocándolas en el recipiente de descarte, junto con los aplicadores y los papeles que eventualmente se hubieran utilizado en todas las etapas, y los guantes desechables.

-Autoclavar este recipiente al final de cada jornada.

-Si es imposible autoclavar agregar 10 gotas de fenol al 5% al remanente de las muestras no utilizado, dejar los envases tapados hasta el día siguiente, y despacharlos luego con los desechos patógenos habituales del laboratorio para que sean esterilizados por el servicio que se encarga de esta tarea.

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

### 3.8 DERIVACIÓN DE MUESTRAS PARA CULTIVO

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

### 3.9 CONTROL DE CALIDAD DE LAS BACILOSCOPIAS

El control de calidad permite evaluar si la información producida por el laboratorio es precisa, reproducible y oportuna. Instaura un sistema de alarmas que permite prevenir, descubrir y corregir errores. Resulta más eficaz para detectar y asistir a los casos de tuberculosis y para controlar la enfermedad.


#### 3.9.1 Control de colorantes y microscopios:

-Tratar muestras positivas y negativas tratadas previamente con 10 gotas de fenol 5% durante por lo menos media hora. Preparar con ellas tantos extendidos como sean necesarios, para que puedan ser utilizados durante dos meses. Si no se reciben suficientes muestras positivas, solicitar los extendidos al laboratorio de referencia. Guardarlos en cajas con separaciones, diseñadas para guardar extendidos, o dentro de una caja envueltas en papel suave, bien acondicionados, en lugar seco.

-Controlar la calidad de cada nuevo lote de colorantes tiñendo una lámina negativa y otra positiva. Registrar el resultado de este control en el libro de preparación/control de reactivos.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente



 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 22 de 31

-Comprobar que los BAAR se vean completa e intensamente coloreados con fucsina o auramina y que la coloración de fondo sea uniforme, del color esperado y que ofrezca buen contraste. Si en los extendidos positivos no se detectan BAAR o los BAAR están mal teñidos la fucsina o la auramina es defectuosa. Si observa una coloración de fondo violácea con la tinción de Ziehl Neelsen, el decolorante o el colorante de fondo pueden estar defectuosos. Si se observan aparentes BAAR en el extendido negativo, puede ser que el decolorante esté defectuoso o que haya contaminante ácido-alcohol resistente en las soluciones de colorantes.

-Verificar si la cuantificación de bacilos coincide con la inicialmente asignada a la muestra con la que se prepararon los extendidos positivos. Registrar los resultados de estos controles de calidad

-Si se detectan defectos, repetir el control con otros extendidos para descartar un posible error en la técnica de tinción. Si persiste el defecto, descartar los reactivos defectuosos o contaminados.

-Si se realizan más de 10 baciloscopias por día, se debe repetir el control arriba descrito (coloración de un extendido positivo y uno negativo) una vez por semana. Si se realizan menos de 10 baciloscopias por día se deben incluir los frotis positivo y negativo como control diariamente.

#### 4. CULTIVO PARA TUBERCULOSIS

El cultivo produce resultados tardíamente, pero es más sensible que la baciloscopia. Puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) presentes en una muestra, si es realizado en forma adecuada. Permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos. Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar. Si se considera el total de casos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmado bacteriológicamente, la baciloscopia detecta el 70-80% y el cultivo 20-30% el restante. Estas cifras están condicionadas por la situación epidemiológica. Entre los casos con tuberculosis Extra pulmonar el aporte del cultivo al diagnóstico es muy variable según la localización de la patología.

Mediante el cultivo es posible aislar los BAAR presentes en una muestra en cantidad suficiente como para identificarlos por métodos bioquímicos, toda vez que sea necesario. Es preciso hacerlo cuando se procesan muestras provenientes de pacientes infectados por HIV que pueden estar afectados por tuberculosis, pero también, con mayor frecuencia que los pacientes inmunocompetentes, por una micobacteriosis. También es necesario en el caso de muestras en las que puede haber micobacterias ambientales colonizantes (lavado gástrico, orina). Por su sensibilidad y porque detecta únicamente bacilos vivos, el cultivo es el mejor método para demostrar la curación de un paciente al finalizar el esquema terapéutico.

El cultivo permite realizar la prueba de sensibilidad a los antibióticos, identificar a los casos que necesitan una reformulación de la quimioterapia y orientar la conformación de un nuevo esquema de tratamiento. Para este fin, es necesario cultivar las muestras de pacientes que tienen riesgo de estar afectados por tuberculosis resistente al esquema estandarizado de primera línea. Son los pacientes que tienen antecedentes de tratamiento antituberculoso, sospecha de falla de tratamiento o de contagio con un bacilo resistente a las drogas. El cultivo es el mejor método disponible para cerciorar falla de tratamiento. Para detectarlos, evitando demoras, se cultivan las muestras de casos bajo tratamiento con baciloscopia positiva al finalizar el segundo mes de quimioterapia, y se realiza la prueba de sensibilidad inmediatamente después de desarrollado el cultivo en el caso en que la baciloscopia persista positiva en el siguiente control.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

### **Uso selectivo del cultivo**

En el momento de diagnóstico

Cultivar todas las muestras de pacientes sintomáticos, con signos clínicos y/o radiografía u otras imágenes compatibles con tuberculosis y alguna de las siguientes características:

- baciloscopia negativa de 3 muestras respiratorias
- localización extra pulmonar de la enfermedad
- niños
- inmunosuprimidos, particularmente HIV positivos
- baciloscopia positiva en lavado gástrico, lavado bronquial o hisopados
- antecedentes de tratamiento antituberculoso, especialmente si se registró abandono o fracaso
- exposición a infección por bacilos resistentes a las drogas (contactos de casos con tuberculosis resistente, internados o trabajadores de instituciones de salud o de prisiones donde se registran casos con tuberculosis multirresistente)

### **Durante el control de tratamiento Cultivar muestras de**

- casos de tuberculosis crónicos o con baciloscopia positiva en el control del segundo mes de quimioterapia o en un control posterior
- casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento Para la vigilancia de la resistencia a drogas antituberculosas Cultivar las muestras de casos bajo estudio o vigilancia según lo establecido en el protocolo de trabajo


**Para la vigilancia de la resistencia a drogas antituberculosas :** Cultivar las muestras de casos bajo estudio o vigilancia según lo establecido en el protocolo de trabajo.

Mediante el cultivo es posible hacer que los bacilos presentes en las muestras de los pacientes se multipliquen in vitro, hasta que se muestren formando colonias en un medio sólido, turbidez en un caldo o hasta que algún sensor incorporado en el medio cambie de color o emita fluorescencia cuando el bacilo consume O<sub>2</sub> o libera CO<sub>2</sub>.

### **4.1 Persistencia del bacilo en muestras de la lesión**

Las micobacterias ambientales pueden sobrevivir fuera del hospedador, si las condiciones no son extremas, pero los integrantes del complejo M.tuberculosis resisten menos fuera de él. De manera que la probabilidad de hacerlos reproducir en el cultivo aumenta con la rapidez con la que se siembre la muestra de la lesión del paciente. La demora es muy crítica cuando el número de bacilos es escaso o cuando el pH de la muestra es desfavorable para la sobrevivencia del bacilo, como en el caso de lavados gástricos y orinas. Aunque es desventajosa porque permite la reproducción de la flora contaminante, no es tan grave la postergación de la siembra de muestras

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 24 de 31

de esputo que contienen alto número bacilos (baciloscopia positiva); con ellas se han obtenido cultivos positivos hasta 15 días después de la recolección

La luz solar, desecación y el calor son condiciones micobactericidas. En cambio, el bacilo resiste a temperaturas muy bajas y su viabilidad puede ser preservada durante plazos crecientes entre los 2-4 °C y -70 °C.

#### 4.2 Resistencia del bacilo a agentes descontaminantes

Comparado con otras bacterias que se reproducen en pocos minutos, todos los integrantes del complejo *M. tuberculosis*, y varias micobacterias ambientales proliferan muy lentamente. En condiciones favorables de laboratorio, el bacilo de la tuberculosis se divide cada 18 a 24 horas. Las secreciones del aparato respiratorio que han atravesado las vías altas, la orina que pasó por la uretra, las muestras del tracto digestivo y las lesiones superficiales de piel contienen flora habitual o contaminante que se multiplica cada 15-60 minutos. Por esta razón no es posible aislar al bacilo de la tuberculosis inoculando estas muestras directamente en placas con medios de cultivo y seleccionando colonias por su morfología. Con este procedimiento, los gérmenes comunes acompañantes ocupan el medio de cultivo en pocas horas impidiendo que aparezca el bacilo de la tuberculosis.

Las micobacterias pueden resistir a ciertos desinfectantes como el cloruro o bromuro de cetilpiridinio y el trifosfato de sodio que pueden ser utilizados para el transporte de muestras durante un tiempo prolongado. Por el contrario, son letales para el bacilo algunos conservantes como fenol, formol o de formaldehído, algunos son utilizados para investigaciones histológicas.

Si las muestras contienen gérmenes comunes y no han sido descontaminadas durante su transporte, se requiere un tratamiento especial para aislar el bacilo de la tuberculosis u otras micobacterias. Es necesario homogeneizar las muestras densas, como los esputos, y eliminar la flora acompañante mediante un proceso de descontaminación. Esto es realizado generalmente con una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH).

El bacilo de la tuberculosis es más resistente que los gérmenes comunes al tratamiento con descontaminantes, pero una proporción no despreciable de BAAR muere durante el procedimiento, entre 30 y 60 % dependiendo del método. El efecto letal es mayor cuanto mayor es la concentración de la base y cuanto más prolongado es el tratamiento. De manera que es necesario ser preciso al preparar la solución descontaminante y al controlar el tiempo de contacto con ella para preservar la viabilidad del bacilo de la tuberculosis, tanto como sea posible.


#### 4.3 Exigencias para el desarrollo del bacilo in vitro

##### -Nutrientes en los medios de cultivo

El bacilo de la tuberculosis puede crecer utilizando glicerol como fuente de carbono, y asparagina e iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes. Metaboliza el glicerol a piruvato. *M. bovis* raramente crece a partir de una muestra clínica en un medio con glicerol porque no puede procesar este compuesto o lo hace con mucha dificultad, prefiere un medio con piruvato o glutamato de sodio. Otro componente clave para el desarrollo del bacilo es la albúmina, habitualmente incorporada en los medios de cultivo con el agregado de huevos de gallina o soroalbúmina bovina.

Algunos medios sintéticos contienen biotina y catalasa para estimular el desarrollo de bacilos dañados. Es posible distinguir las colonias características de *M. tuberculosis* desarrolladas en un medio sólido a base de huevos coagulados o conteniendo agar. El medio con agar transparente

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 25 de 31

facilita la visualización de colonias pequeñas y puede ser inspeccionado con una lupa o microscopio, lo que adelanta la detección de los cultivos positivos. En cambio, cuando se detecta desarrollo en un medio líquido es necesario verificar mediante una baciloscopia si se trata de BAAR, porque visualmente es muy difícil distinguir el desarrollo del bacilo de la contaminación

El caldo y agar enriquecido favorecen el desarrollo de las micobacterias, particularmente de las ambientales, pero también de la flora contaminante. Cuando se utilizan estos medios para inocular muestras, normalmente se agrega una mezcla con antibióticos inocuos para las micobacterias pero que contribuyen a impedir el desarrollo de la contaminación.

#### **-Condiciones y tiempo de incubación**

El bacilo de la tuberculosis se ha adaptado a vivir a la temperatura corporal del hombre y en la oscuridad. Se multiplica mejor cerca de los 37 °C, la velocidad de desarrollo disminuye al alejarse de esa temperatura, muy difícilmente crece por debajo de los 34 °C y puede morir por encima de los 40 °C. La luz solar (UV) es perjudicial para su sobrevivencia

Algunas micobacterias ambientales prefieren temperaturas más bajas para desarrollar especialmente las que suelen afectar a la piel y tejidos superficiales

El tiempo en el que detecta un cultivo positivo depende de lo enérgico del método de descontaminación aplicado, del pH al que haya quedado el inóculo luego del tratamiento, de la riqueza del medio de cultivo y de que éste contenga o no algún sensor que evidencie el desarrollo antes de que se haga visible. Pero también depende de las características peculiares de algunas cepas del bacilo, de la cantidad de bacilos que haya en la muestra de la lesión y del tiempo durante el cual se ha administrado tratamiento antituberculoso al paciente. Existen cepas de bacilos y clones multirresistentes que son más fastidiosos para multiplicarse. La mayor parte de las muestras con baciloscopia 3+ evidencian desarrollo dentro de las primeras 3 semanas de incubación en medios a base de huevos, y dentro de los 10 días en medios más ricos. A partir de muestras con muy escasos bacilos, no detectables por baciloscopia, las colonias aparecen tardíamente, aproximadamente hasta 8 semanas después de la siembra en medios a base de huevos y hasta 6 semanas de ser sembradas en agar o caldos enriquecidos.

Tan prolongada incubación a 37 °C debe ser hecha en tubos, viales o botellas que además de ofrecer bioseguridad, eviten la desecación. A la vez el bacilo es aerobio estricto y por eso debe quedar atrapada una atmósfera de oxígeno dentro del tubo, vial, botella o placa. En general es mejor el desarrollo en tubos grandes. Las placas con agar son colocadas dentro de bolsas de polietileno para evitar la desecación, pero deben ser permeables al pasaje de aire. Una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10% durante la primera semana de incubación favorece el desarrollo de las micobacterias en caldos o medios con agar, aunque no es indispensable.


#### **4.4 TOMA, RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS PARA CULTIVAR**

En particular, es preciso tener presente que para el cultivo es fundamental observar las siguientes recomendaciones:

-Procesar las muestras con la menor demora posible.

-Preservar las muestras de la luz solar, desecación y el calor. Mantenerlas refrigeradas a 4° C hasta el momento de su procesamiento si inevitablemente debe transcurrir más de 24 horas desde la recolección hasta la siembra.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 26 de 31

-Cuando la muestra de esputo debe ser transportada y queda inevitablemente expuesta a temperatura ambiente durante más de 48 horas después de recolectada, agregar igual volumen de cloruro o bromuro de cetilpiridinio 1% disuelto en una solución de cloruro de sodio al 2%. Estos reactivos homogeneizan el mucus y restos orgánicos y descontaminan la muestra durante el transporte. En este caso, la muestra no debe ser refrigerada porque estos descontaminantes cristalizan a baja temperatura y, una vez cristalizados, no protegen e inhiben el desarrollo del bacilo de la tuberculosis. Se ha descrito que estas soluciones pueden inhibir el desarrollo del bacilo en medios líquidos y por eso se ha recomendado no utilizarlos cuando se emplean estos caldos.

-Nunca agregar a las muestras fenol, formol o solución de formaldehído. Algunos anestésicos tienen actividad antimicrobiana y por lo tanto también deben ser evitados. Esto puede ser desconocido por el equipo médico que toma biopsias y sigue procedimientos indicados para estudios histopatológicos, inadecuados para el cultivo de micobacterias y también de otros microorganismos.

#### 4.5 Procedimiento para realizar cultivos en Kudoh Ogawa

Requiere un hisopo o escobillón estéril de uno 15 mm de longitud y un tubo de vidrio o plástico conteniendo 3 ml de solución de NaOH al 4% por cada muestra a procesar.

La contaminación puede resultar superior al 10 % utilizando este método. Se ha descrito que es posible disminuir este nivel de contaminación sin afectar la sensibilidad del método, tratando las muestras de esputo con igual volumen de fosfato trisódico 4,3 % durante 24 horas antes de proceder como sigue.

-Abrir el primer envase. Elegir y recolectar con el hisopo las partículas útiles, mucopurulentas del esputo adhiriéndolas al hisopo o escobillón estéril. Cerrar el envase.

-Sumergir el escobillón en un tubo con 3 ml de solución de NaOH 4% durante 3 minutos.

-Retirar el escobillón, sin escurrir, y sembrar con él dos tubos con medio de Ogawa acidificado, con movimientos de rotación y presión

-Descartar el hisopo o escobillón en un recipiente destinado a ser auto clavado.

-Repetir el procedimiento con las siguientes muestras

-Inclinar los tubos inoculados e incubar a 37°C, Verificar que los tubos queden con su pico de flauta hacia arriba, sin posibilidad de girar sobre sí mismos, y la siembra bien distribuida en toda su superficie.

#### 4.6 Control visual periódico

Mantener los tubos en incubación hasta las 8 semanas en el caso de medios a base de huevos, Inspeccionarlos bajo una buena fuente de luz que permita observar con claridad hasta las colonias más pequeñas, siguiendo el siguiente plan.


**A los 2-3 días después de sembrados:** Verificar si

-hay indicios de mala neutralización de la muestra

-se detecta contaminación

-la siembra está absorbida y el líquido se ha evaporado

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 27 de 31

Cuando quedan restos de hidróxido de sodio en el inóculo, los medios a base de huevos se aclaran hacia un tono amarillento que los diferencia del resto de los tubos sembrados. En tal caso, registrar la observación. Ciertos microorganismos contaminantes proteolíticos desintegran el medio de cultivo. Otros producen ácido a partir de los constituyentes del medio, bajan el pH y desintegran el verde de malaquita del medio el que, entonces, adquiere color verde oscuro. El bacilo de la tuberculosis no crece en el medio desintegrado ni en el acidificado.

-Si se detecta contaminación en toda la superficie de un medio sólido o en un caldo, registrarla en el libro del laboratorio y descartar el tubo/placa/botella

-Si se detecta contaminación o pH inadecuado (viraje hacia al amarillo o verde intenso) en todos los tubos sembrados con la muestra de un paciente, producir de inmediato el informe para comunicar este resultado

-Si se detecta contaminación sólo en un área pequeña de la superficie de un medio sólido, volver a incubar para dar oportunidad a que desarrolle el bacilo de la tuberculosis en la parte no contaminada.

-Si la siembra está absorbida, ajustar la tapa para evitar la desecación del medio. Para hacer mejor uso del espacio de la estufa de incubación, en este momento es posible ubicar los tubos en posición vertical dentro de una caja de plástico u de otro material que pueda ser descontaminado, resistente y segura, y rotulada con la fecha de los tubos que contiene,

-Si la siembra no está absorbida, mantener el tubo inclinado, inspeccionar los días siguientes hasta comprobar que así sea y proceder a ajustar la tapa y eventualmente poner los tubos en posición vertical

-Solicitar y procesar una nueva muestra del paciente, toda vez que sea posible, cuando se ha detectado contaminación o pH inadecuado del medio en todos los tubos sembrados

#### **A los 7 días después de sembrados y, luego, una vez por semana:**

-Identificar tubos/placas o caldos contaminados y proceder como se ha descrito más arriba. Un tubo contaminado tardíamente puede enmascarar el desarrollo de *M. tuberculosis*, por lo que antes de descartarlo es conveniente hacer un frotis con material del medio y colorear por Ziehl Neelsen. Si se detectan BAAR proceder a descontaminar el cultivo para intentar aislar el bacilo en un nuevo tubo con medio de cultivo. Puede ser necesario recurrir al uso de soluciones ácidas para eliminar cierto tipo de contaminación.

-Identificar los tubos con desarrollo del bacilo de la tuberculosis o de otras micobacterias.


-Registrar el desarrollo en el momento en que se observa y seguir los procedimientos para producir el informe con la menor demora posible

**4.7 Registro de resultados:** Consignar en el registro del laboratorio el resultado del cultivo en medios sólidos de la siguiente de forma

Registrar	Si se observa	
Contaminado	Todos los tubos inoculados con la muestra contaminados	
Negativo	Sin desarrollo luego de la inspección de la octava semana de incubación	
El número de colonias exacto	entre 1 y 19 colonias en el total de medios sembrados	
+	20 a 100 colonias	
++	Más de 100 colonias	(colonias separadas)
++	Colonias incontables	(colonias confluentes)

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente



 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 28 de 31

La cantidad de colonias es la suma obtenida en todos los tubos si desarrollan hasta 19 colonias. Si supera este número, para transformar la lectura en escala de cruces, se promedia el desarrollo observado en todos los tubos. El promedio es exacto cuando se pueden contar las colonias o estimado en el caso en que supere la cantidad posible de contar.

Toda vez que se detecte desarrollo, consignar en el registro del laboratorio:

- Fecha en la que se observó el desarrollo
- Cuantificación del desarrollo según la escala presentada
- Morfología de las colonias (rugosas, lisas, toda característica peculiar)
- Pigmentación de las colonias (no pigmentada, amarillenta, anaranjada).


Una vez registrado un cultivo positivo se debe remitir al laboratorio de referencia para realizar prueba de sensibilidad a antibiótico.

#### **4.8 Descarte de tubos inoculados**

Descartar los tubos, frascos, placas con medios inoculados, con o sin desarrollo, en un recipiente donde serán autoclavados durante 1 hora a 121 °C, antes de ser reciclados. Las placas deben ser ubicadas dentro de bolsas autoclavables para poder ser desechadas luego del autoclavado.

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente




 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 29 de 31

## 5. BIBLIOGRAFÍAS

1. <http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloscopia.pdf>
2. <http://www1.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-cultivo.pdf>

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente

 <b>E.S.E. RAFAEL TOVAR POVEDA</b>	<b>MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS</b>	Código: AS-ADT-LC-M04
		Versión: 01
		Fecha de vigencia: 01/06/2020
		Página 30 de 31

## 6. CONTROL DE CAMBIOS

FECHA DE CAMBIO	CAMBIO EFECTUADO	RESPONSABLE	NUEVA VERSIÓN
Junio de 2020	Elaboración del documento.	Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	01
30/06/2020	Aprobación del documento mediante Resolución 1150 de 2020	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente	01

ELABORÓ	REVISÓ	APROBÓ
Llanerys Amaya Pérez Bacterióloga IPS Hospital Local Curillo	Lina Marcela Giraldo Rincón Subgerente Científica	Faiber Andrés Salazar Penha Gerente