MINISTERIO DE SALUD

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DIRECCIÓN DE REGULACIÓN
PROGRAMA NACIONAL DE TUBERCULOSIS Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS POR MICROSCOPÍA DIRECTA

EL SALVADOR, C.A. OCTUBRE DEL 2008

EL SALVADOR

Documento Digitalizado

AUTORIDADES DEL MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL

DR JOSÉ GUILLERMO MAZA BRIZUELA
MINISTRO DE SALUD PÚBLICA

DR. JOSÉ ERNESTO NAVARRO MARÍN
VICEMINISTRO DE SALUD PÚBLICA

DR. JOSÉ ROBERTO RIVAS AMAYA
DIRECTOR DE REGULACIÓN

DR. HUMBERTO ALCIDES URBINA
DIRECTOR GENERAL DE SALUD

DR. MARIO VICENTE SERPAS
DIRECTOR DE VIGILANCIA DE LA SALUD

DRA. ENA GARCÍA
DIRECTORA DE PLANIFICACIÓN

LIC. JUDITH ZARATE DE LÓPEZ
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN Y FINANZAS

Documento Derogado

CRÉDITOS.

Dr. Julio Garay Ramos	Jefe de Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (PNTYER).
Licda. Ana María Fuentes de Mendoza	Colaborador técnico de Laboratorio Clínico Región Metropolitana.
Licda. Ana Gloría Martínez	Jefe de Laboratorio Clínico Unidad de Salud La Herradura.
Licda. Alicia Calderón de Lovo	Responsable del centro de referencia de Control de calidad de baciloscopía del ISSS.
Licda. Guadalupe Cárcamo de García	Jefe de Laboratorio Clínico Unidad de Salud de Sonzacate.
Licda. Karla Vanessa Moreno de Cisneros	Profesional Laboratorio Clínico Hospital San Juan de Dios de San Miguel.
Licda. Margarita Ramírez	Jefe de Sección de Tuberculosis Laboratorio Central Dr. Max Bloch.
Lic. Nelson Linares	Jefe de Laboratorio Clínico Unidad de Salud de Guazapa.
Licda. Rosa María Jiménez	Profesional Laboratorio Clínico Sección de Tuberculosis Laboratorio Central Dr. Max Bloch.
Lic. René Guevara Hernández	Supervisor de Laboratorio Clínico PNTYER.
Licda. Sonia Velásquez de Pérez	Coordinadora de Gestión de la Calidad Laboratorio Central D. Max Bloch.
Licda. Transito Cecilia Pérez Rivera	Jefe de Laboratorio Clínico Unidad de Salud Quezaltepeque.
Licda. Yanira Meléndez	Jefe de Laboratorio Clínico Hospital Nacional Saldaña.
Dra. Mayra Sáenz de Hernández	Colaborador técnico Unidad de Normalización Dirección de Regulación.

Documento Derogado

PRESENTACIÓN.

La investigación temprana de los sintomáticos respiratorios, es una de las primeras actividades que se realizan para el control de la tuberculosis, ya que la realización de las baciloscopías de los sintomáticos respiratorios, permite detectar a los casos de tuberculosis pulmonar baciloscopía positiva que son la fuente de contagio en la comunidad, para someterles de forma temprana a tratamiento acortado estrictamente supervisado, cortando así la cadena de transmisión.

Lo anterior es gracias al trabajo realizado por todos los proveedores de salud que participan en la búsqueda de casos de tuberculosis pulmonar baciloscopía positiva, pero principalmente a todos los profesionales de laboratorio clínico que realizan el examen de baciloscopía, en cualquier laboratorio que laboren y que aplican los procedimientos técnicos administrativos estandarizados en el país, lo que contribuye a disminuir la prevalencia, incidencia y mortalidad por tuberculosis, lo cual impacta de manera importante en la reducción de la pobreza y de las necesidades vitales de las personas con tuberculosis, su familia y la comunidad.

Cumpliendo con la función reguladora y rectora se ha elaborado el presente **"Manual de Procedimientos para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis por Microscopía Directa"**, dirigido a todos los profesionales de laboratorio clínico que realizan baciloscopía, con el propósito de contar con este Manual técnico-administrativo, que facilite la participación en la detección de casos de tuberculosis pulmonar baciloscopía positiva y a los logros de los indicadores, para el control de esta enfermedad como problema de salud pública en un futuro cercano.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
SAN SALVADOR, C.A.

Dr. José Guillermo Maza Brizuela
Ministro de Salud

Documento Derogado

INDICE

1. INTRODUCCIÓN..... 1
2. OBJETIVOS..... 2
3. MARCO CONCEPTUAL..... 3
4. ORGANIZACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE BACTERIOLOGÍA DE TUBERCULOSIS..... 5
5. TOMA DE MUESTRA..... 7
6. OTROS TIPOS DE MUESTRAS..... 13
7. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS..... 18
8. EQUIPOS, MATERIAL Y REACTIVOS NECESARIOS..... 22
9. LUGAR DE TRABAJO Y MATERIALES..... 26
10. PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO..... 27
11. COLORACIÓN..... 31
12. EXAMEN MICROSCOPICO..... 34
13. BIOSEGURIDAD..... 38
14. SUPERVISIÓN Y CONTROL DE CALIDAD..... 43
15. SISTEMA DE REGISTRO..... 49
16. ANEXOS..... 50
17. ABREVIATURAS Y SIGLAS..... 67
18. BIBLIOGRAFÍA..... 68

Documento Derogado

1. INTRODUCCIÓN.

El Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias de El Salvador, reconoce que los servicios de bacteriología son fundamentales para: el diagnóstico de los casos, seguimiento de los resultados del tratamiento y verificación de la curación de los pacientes. En ese sentido los servicios de laboratorio son un componente esencial de la Estrategia STOP-TB (alto a la tuberculosis) principalmente en su componente 1: ***"Proseguir la expansión de un TAES de calidad y mejorarlo";*** ya que el diagnóstico sólo puede hacerse en forma confiable demostrando la presencia del bacilo, por medio de la microscopía o de los cultivos BAAR (bacilo alcohol ácido resistente), por lo tanto la seguridad y garantía de la calidad de los laboratorios de tuberculosis es determinante en la eficacia del programa.

Tomando en consideración las condiciones y complejidad de la red de laboratorios del Ministerio de Salud, las técnicas a utilizar deben ser sencillas, realizables (por todos los profesionales y técnicos de laboratorio clínico) y con alto grado de confiabilidad de los resultados obtenidos; así también, se reconoce que la capacitación continua del personal es esencial para mejorar la eficiencia.

La estandarización de las técnicas básicas de bacteriología de la tuberculosis es necesaria para obtener resultados comparables y confiables en todo el país; por tal razón se ha elaborado el presente **"Manual de Procedimientos para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis por Microscopía Directa"**, la cual tiene como propósito orientar a los profesionales y técnicos de laboratorio sobre aspectos técnicos, administrativos y procedimientos a ejecutar en la toma, envío, recepción, registro, procesamiento de muestras y entrega de resultados para la bacteriología de la tuberculosis.

Documento Derogado

2. OBJETIVOS.

2.1 GENERAL:

- Proporcionar los lineamientos técnicos administrativos, para la detección de casos de tuberculosis pulmonar, por medio de la Microscopía Directa.

2.2 ESPECIFICOS:

- Cumplir con los Estándares y Recomendaciones Internacionales proporcionados por OPS/OMS, en el Diagnóstico Bacteriológico por Microscopía Directa.

- Estandarizar el reporte de las baciloscopías a nivel nacional.

- Proporcionar a los profesionales de laboratorio clínico las herramientas para el diagnóstico de la tuberculosis por Microscopía Directa.

Documento Derogado

3. MARCO CONCEPTUAL.

La Tuberculosis es una enfermedad transmisible, causada por un microorganismo en forma de bacilo llamado Mycobacterium tuberculosis. Cuando este microorganismo entra al cuerpo a través del aparato respiratorio, se localiza principalmente en los pulmones, pero puede raramente, localizarse en riñones, huesos, aparato digestivo, ganglios linfáticos, sistema nervioso central, articulaciones o en cualquier otro lugar del organismo a través de la vía hematógena.

La transmisión de la enfermedad se produce generalmente por inhalación de este bacilo, el cual es expulsado por un paciente con tuberculosis, al toser, estornudar, hablar, cantar o por cualquier esfuerzo respiratorio.

Después de tres a cuatro semanas de adquirir la infección, se producen lesiones en los pulmones. La extensión de la lesión depende del número de bacilos inhalados, del estado nutricional y de las defensas de la persona infectada. Si bien, son muchas las personas que se infectan con el bacilo, pocas de ellas desarrollarán la enfermedad.

Síntomas más frecuentes de la enfermedad:

- Tos persistente por más de dos semanas, con expectoración, algunas veces con estrías de sangre.
- Dolor en el pecho.
- Pérdida del apetito y pérdida de peso.
- Sudoración nocturna y a veces febrículas.

El diagnóstico se confirma por el examen microscópico directo del esputo (baciloscopía) o de otro tipo de muestra en los casos de Tuberculosis extrapulmonar (para lo que debe realizarse el cultivo de BAAR, para confirmar el diagnóstico).

El tratamiento usado actualmente en El Salvador para pacientes nuevos es a base de medicamentos principalmente combinados de 4 drogas {Isoniacida (H), Rifampicina (R),

Documento Derogado

Pirazinamida (Z) y Etambutol (E)} y de 2 drogas combinado {Isoniacida (H), Rifampicina (R)}. Aunque en algunos casos se utilizan medicamentos individualizados.

En una amplia mayoría, los pacientes con baciloscopía positiva pasan a tener una baciloscopía negativa en los primeros 2 meses de tratamiento.

Para prevenir la enfermedad y lograr su disminución en la comunidad, es muy importante el diagnóstico oportuno y el tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) de los pacientes tuberculosos bacilíferos (infectantes). También, otro elemento fundamental de los programas para la prevención de esta enfermedad, es la vacunación con BCG, quimioprofilaxis en condiciones adecuadas, la educación del paciente y de su familia.

Todo lo anterior está enmarcado en la estrategia STOP-TB cuya finalidad es reducir marcadamente la carga mundial de tuberculosis para el año 2015, en concordancia con los Objetivos de Desarrollo del Milenio y las metas de STOP-TB.

Documento Derogado

4. ORGANIZACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE BACTERIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS.

La bacteriología de la tuberculosis, constituye uno de los aspectos fundamentales del programa nacional de control de la tuberculosis, en estrecha relación con la administración, la epidemiología y la clínica. Los servicios de diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, deben ser desarrollados al mismo ritmo que las demás acciones del programa, procurando la máxima cobertura posible sobre la base de la integración de sus actividades en los laboratorios de salud de la organización sanitario-asistencial del país.

4.1 RED DE LABORATORIOS.

La red de laboratorios está constituida por los siguientes niveles:

1- Nivel Superior: comprende el laboratorio central y de referencia nacional.
2- Nivel intermedio: constituido por los laboratorios regionales.
3- Nivel local: representado por los laboratorios de los establecimientos de salud. Como parte de la organización, incluye a las unidades de recolección de muestras.

Desde el punto de vista de su complejidad técnica, existen tres tipos de laboratorios, según OPS:

1- Tipo I ó A: efectúa baciloscopías, cultivos, pruebas de sensibilidad y pruebas de tipificación.
2- Tipo II ó B: realiza baciloscopías y cultivos.
3- Tipo III ó C: realiza baciloscopías.

El número y la ubicación de los laboratorios de tipo I y II serán determinados por el nivel superior del programa. En todo laboratorio de un establecimiento de salud, aunque sea de complejidad mínima ó básica, se deberá efectuar la baciloscopía, es decir será un laboratorio de tipo III.

Los establecimientos de salud que no cuenten con un laboratorio serán las unidades encargadas de la recolección de muestras.

Documento Derogado

4.2 FUNCIONES GENERALES DE LA RED DE LABORATORIOS.

Es conveniente distinguir dos grandes grupos de funciones que se deben cumplir en la red de laboratorios, las que tendrán mayor o menor relevancia de acuerdo con el nivel del laboratorio de que se trate dentro de la organización.

1- Funciones técnicas: Que consiste en efectuar los exámenes que le han sido asignados de acuerdo con los medios de que dispone, según el tipo de laboratorio, y servir de referencia a los niveles de menor complejidad.

2- Funciones relacionadas con el Programa Nacional de Control de Tuberculosis: Coordinar sus actividades con los niveles superiores e inferiores, supervisar, asesorar, capacitar y evaluar las actividades de acuerdo con las metas programadas.

Documento Derogado

5. TOMA DE MUESTRAS.

En el diagnóstico de la tuberculosis suele centrarse la atención en los problemas de las técnicas de microscopía, mientras que a menudo se pasa por alto el tema de la obtención de muestras adecuadas. Para asegurar que los resultados sean exactos y fiables es preciso que la toma de muestras sea adecuada en calidad y cantidad, colocada en el envase recomendado, bien identificada, debidamente conservada y transportada al laboratorio en el tiempo oportuno.

5.1 ENVASE PARA EL ESPUTO:

Un requisito esencial para la toma de muestras apropiadas es el envase. Estos deben ser rígidos para evitar que se deteriore durante el traslado, tener boca ancha, tapón de rosca que permita taparlos en forma hermética para evitar derrames y contaminación.

Para facilitar la elección de un envase se recomiendan las especificaciones siguientes:

- Plástico -Transparente: para prevenir accidentes, facilitar su eliminación, observar el volumen y la calidad de la muestra sin abrir el envase.
- Boca ancha: (no menos de 35 mm de diámetro), para que el paciente pueda expectorar cómodamente dentro del envase sin contaminar el exterior.
- Tapa de rosca: a fin de asegurar un cierre hermético y reducir el riesgo de derrames durante el transporte.
- Capacidad: de 35 – 40 ml.
- Fácil de rotular: lo que permitirá una identificación indeleble o la colocación de una viñeta.

NOTA: No reutilizar los frascos para evitar la manipulación de material potencialmente infeccioso y posibles errores en la baciloscopía originados en la transferencia de material de una muestra a otra.

Documento Derogado

5.2 RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.

El primer paso para asegurar la calidad de la baciloscopía consiste en explicar con claridad al Sintomático Respiratorio, la importancia del examen, la necesidad de obtener una buena muestra de esputo y no saliva, la forma de lograrlo, dónde colectarla, cómo manipularla hasta entregarla en el laboratorio.

Aunque *M. tuberculosis* puede causar enfermedades en casi cualquier órgano del cuerpo, en los países donde la prevalencia de tuberculosis es elevada, más del 85% de los casos son pulmonares.

El esputo es la muestra ideal para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Si se sospecha de enfermedades extrapulmonares pero se observan síntomas respiratorios será preciso tomar además de cualquier muestra de material extrapulmonar; también muestras de esputo.

Para obtener una buena muestra de esputo es necesario dar al paciente instrucciones precisas. Cuando el paciente tose para producir una muestra de esputo pueden formarse aerosoles que contienen bacilos de la tuberculosis; por consiguiente, los pacientes deben producir la muestra al aire libre o lejos de otras personas y no en locales con poca ventilación como los servicios sanitarios.

Algunos pacientes pueden presentarse directamente al laboratorio para el diagnóstico, por lo que es conveniente que el personal de laboratorio conozca el método correcto para la obtención de la muestra de esputo.

Documento Bercgado

5.3 TOMA DE MUESTRAS DE ESPUTO.

PROCEDIMIENTO.

1. Explicar al paciente la importancia de la toma de muestra de esputo.
2. Orientar al paciente que se enjuague la boca con agua antes de emitir la muestra. Esto contribuirá a eliminar restos alimenticios y eliminar la acumulación bacteriana proveniente de la boca.
3. Indicar al paciente que debe sonarse las secreciones nasales para evitar que estas sean dadas como muestra.
4. Elegir un lugar bien ventilado y que ofrezca privacidad. Puede ser una habitación ventilada y con acceso de luz natural (sol) o algún lugar abierto no concurrido por otras personas, como por ejemplo el patio del establecimiento 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 obtención de la muestra de esputo).
5. Entregar al SR el envase de recolección ya rotulado con su nombre completo y el número de muestra correspondiente (primera, segunda, tercera ó primera o segunda de control de tratamiento y el mes correspondiente) Estos datos deben ser colocados en el cuerpo del frasco y no en la tapa.
6. Solicitar al SR una buena muestra de esputo utilizando palabras conocidas en cada lugar (polla, gargajo, esputo, flema, charcha.).
7. Instruir con lenguaje sencillo y comprensible para que tome aire profundamente por la nariz llenando sus pulmones y que lo retenga tanto como le sea posible.
8. Indicarle que se incline un poco hacia delante y toser fuertemente tratando de arrastrar la flema.
9. Depositar en su totalidad la muestra dentro del frasco, evitando derramarla por las paredes y evitar llenar sus manos.
10. Repetir tres veces los pasos 7, 8 y 9 para obtener una buena cantidad de muestra.
11. Tapar bien el frasco.

Documento Derogado

12. Limpiar el exterior del envase con papel desechable.
13. Entregar el frasco al personal de salud asignado a recibir las muestras y este debe verificar que el frasco este bien cerrado.

5.4 CALIDAD DE LA MUESTRA.

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

Una buena muestra tiene aproximadamente 3-5 ml, es generalmente espesa y mucoide, puede ser fluida con partículas de material purulento, el color es variable (blanco, amarillento, verdoso y a veces sanguinolento). Las secreciones nasales, faringeas o las salivas no son buenas muestras para investigar tuberculosis, aunque es conveniente examinarlas, porque siempre existe la posibilidad que contenga parte de la expectoración o bacilos expulsados por la tos que hayan quedado en la boca, nariz o faringe.

5.5 MOMENTOS DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO.

Como las lesiones causadas por la tuberculosis en los pulmones pueden drenar intermitentemente, es posible que una muestra sea negativa un día determinado y positiva al día siguiente. Por eso, para realizar el diagnóstico deben recogerse 3 muestras de la siguiente manera:

Documento Derogado

- La primera: En el momento de la consulta (al ser captado el SR) una muestra de expectoración recolectada en el mismo lugar, después de haber tosido y aclarado el fondo de la garganta, cumpliendo las indicaciones dadas por un miembro del personal de salud, en un lugar bien ventilado, (nunca en el baño) independiente de la hora y de comida previa.
- La segunda: Será recolectada por el paciente en su casa al despertarse por la mañana.
- La tercera: Solicitarla en el momento que el paciente entrega la segunda muestra.

NOTA: La primera y tercera muestra deben recolectarse bajo la supervisión del personal de salud.

5.6 MOMENTO DE RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA CONTROL DE TRATAMIENTO.

Estas se solicitan al paciente una semana antes de que finalice la fase de tratamiento en la cual está el paciente, para asegurar su resultado en el momento que se realice el cambio de fase de tratamiento o que sirva para determinar la conducta a seguir y se solicitan al final del segundo, cuarto y sexto mes para categoría I (se realizan 2 baciloscopías en dos días consecutivos); y si el esquema es de ocho meses (retratamiento) se tomarán las baciloscopías de control al final del tercero, quinto y octavo mes de tratamiento (se realizan 2 baciloscopía en dos días consecutivos). Ver en norma nacional de programa, seguimiento de tratamiento de categoría I y II respectivamente).

Las muestras para baciloscopía deben transportarse al laboratorio cuanto antes después de su obtención (24 a 48 horas). Si no puede evitarse que el traslado se retrase, las muestras deben refrigerarse o mantenerse en un lugar lo más fresco posible y protegidas de la luz, para evitar el desarrollo de microorganismos contaminantes. (No dejar transcurrir más de 5 días entre la recolección del esputo y el procesamiento de la

Documento Derogado

muestra), por lo que el transporte debe realizarse dos veces por semana, teniendo en cuenta todo lo anterior.

Toda muestra para baciloscopía, debe ir acompañada de su respectiva hoja de: "Solicitud de examen bacteriológico de tuberculosis PCT- 3 (ver anexo 7)" la cual debe ser llenada completa, correctamente y con letra legible por el trabajador de salud que indica la baciloscopía. Es necesario recordar que toda muestra que no sea esputo, debe ordenársele también cultivo; el cual se enviará lo más pronto posible al laboratorio que lo realizará, dentro de las primeras 24 a 48 horas como máximo después de recolectada y mientras se envía conservarla en refrigeración.

Documento Derogado

6. OTROS TIPOS DE MUESTRAS.

Como *M. tuberculosis* puede infectar casi cualquier órgano del cuerpo, el laboratorio podría recibir una variedad de muestras extrapulmonares, como: líquidos corporales, tejidos, pus, orina y otros.

Las ventajas de la microscopía en estas muestras son limitadas y deben remitirlas para su cultivo. La baciloscopía se realiza con el sedimento de la muestra centrifugada previamente durante 30 minutos a 3.000 rpm, por lo que es conveniente que sea hecha directamente en el laboratorio que cultiva la muestra.

6.1 Toma de muestra de orina para cultivo BAAR.

La muestra obtenida de la primera micción de la mañana es la más recomendada, previa higiene externa y el paciente debe recoger no menos de 50 ml del segundo chorro de la primera micción de la mañana (se desecha la primera parte para disminuir la carga de gérmenes contaminantes). Con alguna frecuencia se suelen encontrar en las muestras de orina micobacterias saprófitas, por lo que cuando se trata de investigación para diagnóstico de tuberculosis urinaria, **debe recurrirse al cultivo.**

- Número de muestras: mínimo 3 y máximo 6.
- Envase: de 300 a 500 ml, estéril y boca ancha para facilitar la recolección directa (toda la micción).
- Conservación: la muestra debe ser procesada inmediatamente porque el pH ácido afecta la viabilidad del bacilo. Sí se debe transportar hasta otro laboratorio debe enviarse inmediatamente en cadena de frío.

Debe recordarse que la baciloscopía 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, por lo que el diagnóstico debe ser completado con cultivo y tipificación.

Documento Derogado

6.2 Toma de aspirado gástrico y lavado gástrico.

Generalidades:

- Número de muestras: al menos tres.
- Se emplea especialmente en niños que no saben expectorar y en pacientes con problemas mentales; para detectar bacilos en el esputo ingerido, mientras se encuentran en el estómago.
- Se recomienda utilizar esta muestra sólo para diagnóstico y no en el control del tratamiento.
- Se introduce una sonda de longitud y diámetro adecuado a la edad del paciente hasta el estómago.
- Se utiliza el envase aconsejado para esputo.

- Se debe Ingresar al paciente una noche antes y tomar la muestra a las 5 a.m. antes de que despierte el paciente y 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 (ejemplo: por presencia de la madre ante los lactantes).
- Estas muestras deben ser obtenidas por personal médico experimentado o de enfermería. Para evitar demoras en el procesamiento, la toma de estas muestras debe ser programada en conjunto con el personal del laboratorio.

- La baciloscopía tiene valor relativo; por un lado los pacientes infantiles presentan lesiones que contienen pocos bacilos y por lo tanto es poco probable detectarlos, es posible que la muestra contenga micobacterias ambientales provenientes de alimentos que pueden inducir a resultados falsos positivos.

a) Procedimiento Aspirado Gástrico para estudio bacteriológico.

- Pasar sonda nasogástrica la noche anterior, fijar y marcar el punto de fijación.
- A las 5 a.m. sin despertar al paciente, aspirar el contenido gástrico muy suave, con jeringa para no provocar daño.

Documento Derogado

- Depositar el aspirado en un frasco limpio, en el laboratorio se procede a estabilizar la muestra con bicarbonato.
- Procesar la muestra dentro de las 4 horas siguientes a la recolección.
- Si la muestra es menor de 5 ml realizar lavado gástrico.

b) Procedimiento Lavado Gástrico.

- Una vez que la sonda está en el estómago y no se pudo obtener el aspirado gástrico es necesario introducir a través de la sonda entre 30 y 50 ml de agua destilada estéril o solución salina estéril y aspirar nuevamente muy suave con jeringa para que la succión no provoque daño. Colocando el material en un frasco limpio y de tamaño adecuado.
- La cantidad mínima recuperada debe ser de 20 ml.
- Rotular la muestra como lavado gástrico.
- El material debe ser enviado **inmediatamente al laboratorio**, ya que debe ser cultivado durante las 4 horas siguientes a su obtención.

El material neutralizado con bicarbonato de sodio puede conservarse en refrigeración no más de 24 horas si no se pudo procesar inmediatamente, esto solo en casos especiales.

c) Líquido cefalorraquídeo.

- La obtención de este material está reservada a personal médico.
- Cantidad de muestras: todas las que el médico crea conveniente. Cuanto mayor es la cantidad de muestras procesadas, mayor es la posibilidad de hallazgo de bacilos.
- Tubo estéril de 10 -15 ml de capacidad, con tapa de rosca y cierre hermético.
- No es necesario el uso de anticoagulante.
- Es conveniente procesar el material inmediatamente o almacenarlo a 4° C por un tiempo no mayor de 12 horas.

Documento Derogado

d) Líquidos ascítico, pericárdico, articular, medula ósea y otros.

- La obtención de estos materiales está reservada al personal médico.
- Número de muestras: todas las que el médico considere conveniente.
- Tubo estéril, de capacidad adecuada para la cantidad de la muestra.
- Puede agregarse tres gotas de anticoagulante como citrato de sodio al 10% o EDTA, por cada 10 ml de muestra.
- Es conveniente procesar el material inmediatamente o almacenarlo a 4° C por un tiempo no mayor de 12 horas.

e) Liquido Pleural.

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

f) 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.
- Utilizar envase estéril.
- Agregar 1 ó 2 ml de solución fisiológica o agua destilada estéril para evitar la desecación.
- **No agregar formol a la muestra utilizada para estudio bacteriológico BAAR** porque es letal para el bacilo.
- Para el **estudio histopatológico** la muestra debe ser preservada en formol al 10%.
- El material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio para su cultivo, o ser conservado en refrigeración y protegido de la luz hasta su envío.

Documento Derogado

g) Pus.

- Utilizar 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.
- La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio que hace el cultivo o ser conservada en refrigeración y protegida de la luz hasta su envío.

Documento Derogado

7. RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.

7.1 Recepción de los pacientes:

- La recepción de los pacientes que entregan sus muestras debe ser organizada en un lugar del establecimiento de salud que sea ventilado.
- Debe realizarse de manera ágil, de tal forma que el paciente no espere; la permanencia prolongada de pacientes que están expectorando bacilos en una sala de espera; genera riesgo de transmisión de la tuberculosis en el establecimiento 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 ser colectadas y entregadas en cualquier hora del día, en el momento más adecuado para el paciente, mientras el establecimiento de salud esté abierto.

El laboratorio debe recibir las muestras durante toda la jornada de atención al paciente. El examen debe ser realizado con la mayor premura posible, dentro de una rutina lógica de trabajo.

En el momento de recibir las muestras, se deben completar los siguientes procedimientos:

- Comprobar que los envases de las muestras estén claramente identificados en la pared del frasco, no en la tapa y cerrados herméticamente.
- Verificar que estén acompañados por el formulario de solicitud de baciloscopía (PCT-3).
- 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.
- Insistir en las instrucciones al paciente para la toma de la segunda y tercera muestra.

Documento Derogado

- 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.

7.2 Conservación de las muestras:

Si las muestras de esputo no van a ser procesadas en el día, deben ser conservadas en refrigeración, si no se cuenta con refrigerador, ubicarlas en un lugar fresco y protegidas de la luz.

7.3 Transporte de las muestras:

- Cuando el establecimiento de salud no cuenta con laboratorio, su personal debe conocer a qué laboratorio debe enviar las muestras, cuando y cómo.
- Es recomendable que el transporte sea hecho, por lo menos, dos veces por semana. Se deben establecer los días de la semana en los que se efectuarán regularmente los envíos, el medio de transporte, 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.
- Para el transporte de baciloscopías debe utilizarse la caja de metal proporcionada por el programa de tuberculosis. Estas cajas se descontaminan fácilmente por lavado con solución de hipoclorito de sodio.
- Es recomendable que los frascos conteniendo las muestras se introduzcan en una bolsa de plástico antes de colocarla en la caja metálica.
- Las muestras enviadas para cultivo deben ser transportadas en cadena de frío.
- Cada envío debe ser acompañado por las hojas de solicitud de examen correspondiente (PCT-3) con nombre y apellido, especificando si es muestra para diagnóstico (1ª, 2ª ó 3ª) o para control de tratamiento en la cual se indicará el mes al que corresponde.

Documento Derogado

- Los formularios deben ser enviados en un sobre, fuera de la caja que contiene los envases de las muestras.

Siempre para el envío deben considerarse tres condiciones importantes:

- Proteger del calor excesivo y de la luz solar.
- El riesgo de derrame.
- No remitir a los pacientes a otra unidad solo para recolectar las muestras de esputo.

7.4 Recepción en el laboratorio que hace la baciloscopía.

El personal del laboratorio que recibe las muestras debe:

- Colocarse guantes desechables para recibir las muestras.
- Abrir la caja sobre una mesa de laboratorio o donde procesa su muestra.
- Inspeccionar las muestras controlando si se han producido derrames.
- Desinfectar el exterior de los envases utilizando algodón humedecido con hipoclorito de sodio al 0.5 % si se han producido pequeños derrames durante el transporte. Si el derrame ha sido masivo desinfectar toda la caja.
- Comprobar que las muestras estén bien identificadas.
- Lavarse las manos luego de quitarse los guantes.
- Notificar al servicio que envió las muestras, si se han observado inconvenientes especialmente en la calidad, cantidad de los esputos y en la forma de envío. Debe notificar cuando se está realizando de manera correcta.

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.

Documento Derogado

7.5 Razones para enviar muestra para cultivo:

- Pacientes con alta sospecha de tuberculosis pulmonar cuyas baciloscopías seriadas son persistentemente negativas.
- Para diagnóstico de tuberculosis infantil.
- Para confirmación de diagnóstico de tuberculosis extrapulmonar.
- Casos de VIH positivo y sospecha de tuberculosis.
- Sospecha de fracaso o abandono recuperado.
- Paciente que recae por tratamiento.
- Contacto de tuberculosis MDR confirmado.
- Antecedentes de estancias previas en centros penitenciarios.
- Paciente que no negativiza al segundo o tercer mes de tratamiento.

Es conveniente que la baciloscopia de las muestras extrapulmonares, lavados gástricos y bronquiales, sea realizada en el laboratorio que va a procesar el cultivo.
Los establecimientos de salud recibirán instrucciones especiales para enviar a cultivo las muestras necesarias en el caso que se realice un estudio para vigilar la resistencia a drogas antituberculosas.

Documento Derogado

8. EQUIPOS, MATERIAL Y REACTIVOS NECESARIOS.

EQUIPO.

1. Microscopio binocular.
2. Mechero de alcohol.
3. Reloj marcador de tiempo.

MATERIALES.

1. Varilla de coloración.
2. Bandeja metálica.
3. Caja de metal con tapadera para descarte.
4. Aplicadores de madera.
5. Lámina portaobjeto 3 x 1 pulgada esmerilada.
6. Frascos de vidrio ámbar para colorantes.
7. Plumón indeleble.
8. Gradilla para láminas.
9. Envases plásticos de 40 ml.
10. Papel filtro.
11. Embudos plásticos.
12. Papel toalla o periódico.
13. Lapicero azul.
14. Lapicero rojo.
15. Libro de registro de laboratorio. (PCT 4).
16. Fósforos.
17. Papel limpia lentes.
18. Jabón para manos.
19. Algodón.
20. Caja para transporte de muestras
21. Lápiz grafito.
22. Frascos lavadores.
23. Mascarillas N-95, 1860 BFE.
24. Guantes descartables.

Documento Derogado

REACTIVOS.

1. Fucsina fenicada. 0.3%
2. Alcohol ácido 3%
3. Azul de metileno 0.1%
4. Lejía comercial al 0.5 % o Fenol al 5 %.
5. Alcohol 95º.
6. Aceite de inmersión. (Índice de refracción = 1.515-1.517. Viscosidad = 100-120)

8.1 EL MICROSCOPIO.

El microscopio es el instrumento fundamental del trabajo en el laboratorio.

Como el ojo humano no puede ver los objetos de un diámetro menor que 0.1 mm, las bacterias individuales solo pueden detectarse con un microscopio. La función del sistema de aumento de la lente del microscopio es magnificar los objetos dentro del campo microscópico a un tamaño que pueda ser visto por el ojo humano. Además de la función de ampliación, intervienen otros dos factores de gran importancia: el contraste y la resolución. Para poder ver un objeto mediante un microscopio, aquel debe contrastar en cierta medida con el medio que lo rodea para producir una imagen magnificada clara, el microscopio debe poseer un poder de resolución suficiente como para permitir la observación de los objetos individuales. El nivel de contraste puede aumentarse considerablemente con los procedimientos de tinción, es decir, el tratamiento con colorantes que se unen selectivamente a la célula entera o a ciertos componentes de ésta.

La tinción acidorresistente se usa para obtener información sobre la composición de las paredes de las células de los bacilos de la tuberculosis. Los tipos de microscopía utilizados más comúnmente para examinar los bacilos ácido resistentes son la microscopía de campo claro y la microscopía de fluorescencia. En la microscopía de campo claro, la luz atraviesa los bacilos y la variación del color debido a la tinción permite ver la forma de los organismos.

Para el examen de los frotis teñidos se recomienda utilizar un microscopio binocular (es decir un microscopio con dos oculares).

Documento Derogado

8.1.1 Uso del microscopio.

- Revisar que la fuente de iluminación esté bien regulada y centrada.
- Asegurar que las lentes, y otras superficies que transmiten luz estén bien limpios.
- Ajustar la luz, el condensador y el diafragma a fin de que llegue un haz de luz potente a la lente del objetivo.
- Girar el tornillo de ajuste grueso para alejar el objetivo de la platina.
- Rotar el portaobjetivos para ubicar un objetivo de poco aumento (4x ó 10x) directamente sobre el condensador.
- Colocar el portaobjetos en la platina de modo que el frotis esté directamente debajo del objetivo.
- Mirar la platina desde el costado para determinar qué distancia hay entre el portaobjetos y el objetivo. Girar lentamente el tornillo de ajuste grueso para acercar el extremo inferior del objetivo al frotis, evitando que se toquen.
- Ajustar la intensidad de la luz para que sea brillante pero no incómoda cuando se mira por el ocular. Esto puede lograrse modificando la intensidad de la lámpara, utilizando filtros oscuros, o ajustando el diafragma o el condensador. Generalmente es suficiente ajustar el diafragma.
- Mientras se mira por el ocular, girar lentamente el tornillo de ajuste grueso para alejar el objetivo de la platina. Al cabo de unas pocas vueltas, el frotis debe aparecer en foco.
- Girar el tornillo de ajuste fino hasta que el frotis se vea más claramente.
- Mirar desde el costado, girar el portaobjetivos para seleccionar una lente de mayor aumento. Asegurar que la lente no toque el portaobjetos. El frotis debe estar prácticamente en foco. El enfoque óptimo puede lograrse girando el tornillo de ajuste fino. También puede ser útil ajustar la luz. Asegurar que el condensador esté en la posición superior con el diafragma abierto.
- Para usar la lente con aceite de inmersión, girar el portaobjetivos para que la lente esté ubicada sobre el frotis. Poner una gota de aceite de inmersión en el frotis. (No tocar el portaobjetos con el cuentagotas de aceite; dejar caer libremente la gota sobre el frotis).

Documento Derogado

- Bajar la lente de inmersión de 100x para que entre en contacto con el aceite. Desplazar lentamente la lente de inmersión hacia arriba hasta que aparezca la imagen del frotis. Girar el tornillo de ajuste fino para enfocar.

8.1.2 Cuidados del microscopio.

- Verificar si tiene partes rotas o dañadas.
- El microscopio como instrumento de precisión debe ser cuidadosamente conservado tanto su aspecto óptico como mecánico.
- Cuando no se usa debe estar siempre guardado en caja o protegido del polvo con una cubierta plástica o de tela.
- Debe estar ubicado en un sitio donde no existan reactivos químicos, emanaciones de gases corrosivos o vibraciones.
- Evitar que caiga aceite de inmersión sobre la platina.
- Los objetivos para uso en seco no deben entrar en contacto con el aceite de inmersión, si esto sucede se deben limpiar inmediatamente.
- Para quitar el aceite del objetivo de inmersión debe utilizarse papel especial para lentes, un paño de seda o algodón en seco.
- El microscopio nunca debe desarmarse y si se observa algún defecto debe someterse a una revisión por un mecánico competente.
- Al término de cada jornada de trabajo, limpiar cuidadosamente, especialmente el objetivo de inmersión y dejarlo con algodón o papel absorbente; para evitar el exceso de aceite.
- Al cambiar el microscopio de lugar, se recomienda tomarlo del brazo para no arrastrarlo, evitando daños posteriores.
- A todo microscopio darle cuidado y mantenimiento adecuado.

Documento Derogado

9. LUGAR DE TRABAJO Y MATERIALES.

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

Es recomendable que el área de trabajo sea exclusiva, pero no siempre es posible. Si se debe compartir un área del laboratorio, es necesario escoger un sitio preferentemente alejado de la entrada, para evitar corrientes de aire y movimiento de personal alrededor durante el procesamiento de las muestras.

También es muy recomendable realizar los extendidos y coloraciones en un horario especial, en el momento de menor trabajo en el laboratorio.

Los requisitos mínimos del laboratorio son:

- Buena iluminación.
- Ventanas o extractor para renovar el aire una vez finalizado el trabajo.
- Pisos lavables, que puedan ser desinfectados con solución de hipoclorito de sodio.
- Una mesa para colocar las muestras que se reciban, para realizar los extendidos y 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 mesa se puede utilizar bandejas o cubrir la mesa con un vidrio o papel.
- Un lavabo con fuente de agua y desagüe, en el que se pueda lavar las manos y Realizar la tinción.
- Una repisa o armario para los reactivos, portaobjetos y demás materiales.
- Una mesa para el microscopio.
- Una mesa para escribir los informes y los registros del laboratorio.
- Un lugar para almacenar los frotis.

LOS REACTIVOS PARA COLORACIÓN SERÁN PROPORCIONADOS POR EL LABORATORIO CENTRAL, YA QUE CUENTA CON SU CONTROL DE CALIDAD RESPECTIVO.

Documento Derogado

10. PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO.

Antes de empezar el trabajo, los técnicos deben lavarse las manos y colocarse el equipo de protección personal requerido.

Todas las manipulaciones para preparar el extendido se harán completamente sistematizadas, para lo cual la disposición del material y las muestras deben tener siempre el mismo orden.

Es recomendable que cada serie de muestras a procesar no sea superior a doce. Las láminas deben estar en buen estado (de preferencia nuevas) y desengrasadas previamente.

Inmediatamente que se recibe una muestra, se numera en el cuerpo del envase, así como la orden correspondiente.

Las etapas de preparación del extendido son las siguientes:

1. Colocar sobre la mesa de trabajo una hoja doble de papel periódico, humedecida con la solución de hipoclorito de sodio al 0.5% o fenol al 5 %. Esta hoja de papel constituye el área contaminada, porque sobre ella deben realizarse las etapas más peligrosas de todo el procedimiento, desde la apertura del envase y preparación del extendido hasta el cierre del envase.

Documento Derogado

2. Colocar las muestras sobre la mesa de trabajo en el área delimitada en línea horizontal. Si las muestras han estado en movimiento, dejar reposar los envases durante 20 minutos antes de abrirlos.

3. Para cada muestra numerar una lámina portaobjeto siempre en el esmeril de la lámina. Debe ser el mismo numero asignado de la boleta y el frasco. Una vez numerada se coloca frente al envase correspondiente. (Lo ideal es utilizar láminas esmeriladas y en ese caso se marcarán con lápiz grafito en el esmeril de la lámina.). Durante esta etapa se debe tener la precaución de no tocar con los dedos la parte destinada al extendido porque puede engrasarse.

4. Destapar cuidadosamente sólo el envase de la muestra que se va a procesar, cerca del mechero encendido, el cual estará colocado entre la persona y la muestra, como medio de protección; el envase se coloca en el centro de la mesa de trabajo, sobre el papel junto a la lámina correspondiente, comprobando que ambos tengan el mismo número; se divide el aplicador de madera en dos, utilizando la parte astillada para tomar la partícula útil, constituida por la parte purulenta de la muestra, pues da la mayor seguridad de contener bacilos. Si se observan varias partículas purulentas se mezcla con los aplicadores y se utiliza una porción de la mezcla.

5. Tomar la lámina con los dedos índice y pulgar en el tercio correspondiente al número. Colocar la partícula sobre la lámina extendiéndola con el aplicador realizando movimientos suaves circulares, tratando de dispensarla en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un óvalo de 2 cm. de largo x 1 a 2 cm. de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.

   Para que esta película sea realmente homogénea, es necesario tomar una partícula grande eliminando el sobrante con el mismo aplicador. Nunca debe calentarse la lámina mientras se está haciendo el extendido pues se forman aerosoles, existiendo el riesgo de infectarse a través de las vías respiratorias,

Documento Derogado

además en el extendido se forman círculos concéntricos y precipitados granulosos, la película pierde su homogeneidad dificultando la lectura.

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

6. Al Terminar el extendido desechar los aplicadores en un recipiente con desinfectante. Cerrar el envase y colocar una segunda fila en el mismo orden de la línea de trabajo, detrás de las que aún no se han procesado. Los extendidos se colocan en la parte superior de la gradilla para que sequen a temperatura ambiente. Los envases con las muestras ya procesadas sólo deben ser descartados después de la observación microscópica, colocándoles a cada frasco hipoclorito de sodio al 0.5% o fenol al 5%.
7. Una vez secos los extendidos se fija la lámina, pasándola rápidamente sobre la llama tres veces, cuidando que no se caliente demasiado con el extendido hacia arriba.
8. Colocar los extendidos en un soporte a medida que se van fijando y llevarlos al sitio de coloración.
9. Al finalizar el trabajo, el papel periódico, que constituye el área contaminada y los aplicadores usados, deben ser cuidadosamente descartados en el depósito de material bioinfeccioso.

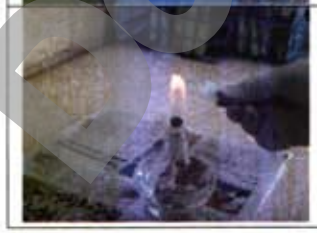
Los extendidos deben ser coloreados de inmediato, ya que algunos bacilos pueden permanecer vivos después de fijados con calor hasta que incorporan la fucsina.

10.1 Descontaminación y desecho del material.

Agregar 10 gotas de hipoclorito de sodio al 0.5% a cada frasco y colocarlos en las bolsas de color rojo para su descarte final según procedimiento empleado en cada establecimiento.

Documento Derogado

PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO.

	ORDENAR LAS MUESTRAS
	MARCAR LOS PORTAOBJETOS
	PARTIR EL APLICADOR
	SELECCIONAR LA PARTÍCULA MÁS PURULENTA
	DEPOSITAR LA MUESTRA EN EL PORTAOBJETOS
	EXTENDER LA MUESTRA UNIFORMEMENTE
	FIJAR EL EXTENDIDO CUANDO ESTÉ TOTALMENTE SECO, PASÁNDOLO RAPIDAMENTE TRES VECES SOBRE LA LLAMA DEL MECHERO DE DERECHA A IZQUIERDA.

Documento Derogado

11. COLORACIÓN.

La técnica aconsejada es la de **Zielh Neelsen.**

1. Filtrar e identificar los colorantes antes de utilizarlos.

2. Colocar la serie de láminas fijadas, conservando el orden numérico sobre la varilla que está en el lavabo, con el extendido hacia arriba separadas una de otra como mínimo un centímetro y con el número hacia el operador.

3. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con fucsina fenicada previamente filtrada. Se calienta suavemente con la llama improvisando una pequeña antorcha, pasándola lentamente por debajo de las láminas hasta que se produzca emisión de vapores; cuando estos sean visibles se deja de calentar. Al cesar la emisión de vapores se calienta nuevamente, se repite esto una vez más hasta completar tres emisiones sucesivas. La fucsina no debe hervir (la pared de los bacilos puede destruirse y colorearse mal) y si disminuye por evaporación o derrame, hay que reponerla porque el extendido debe estar cubierto constantemente durante el calentamiento. El tiempo que lleva el proceso es de **5 minutos**.

   Eliminar la fucsina tomando el portaobjetos por el extremo numerado, inclinándolo hacia adelante y lavar dejando caer una corriente de agua a baja presión sobre la parte esmerilada de la lámina (donde no hay extendido), la que escurrirá suavemente sobre la película.

4. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con alcohol ácido, tomar la lámina entre el pulgar y el índice; hacer un movimiento de vaivén de modo que el alcohol vaya decolorando y a la vez arrastrando suavemente la fucsina. Cuando el alcohol ácido adquiere coloración roja se elimina en la misma forma como se hizo con la fucsina y si el extendido conserva un tinte rosado en sus partes más

Documento Derogado

gruesas, se decolora nuevamente. Se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas conservan solo un ligero tinte rosado. Si las partes más densas quedan mal decoloradas, se pueden observar bacterias teñidas de color rojo que no son micobacterias.
El tiempo de decoloración es de **2 minutos**.

Una vez eliminado el alcohol ácido, lavar nuevamente las láminas como se hizo después de la coloración con fucsina, cuidando de no desprender la película.

5. Coloración de contraste. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con azul de metileno y dejarlo **un 1 minuto**.

   Lavar tanto el extendido como la cara inferior del portaobjetos, procediendo en la forma que se indicó para la fucsina, e ir colocando cada lámina en la gradilla de secado, hasta que se seque a temperatura ambiente, conservando siempre el orden establecido.

Documento Derogado