MINISTERIO DE SALUD DE EL SALVADOR

LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO BAAR

Documento Derogado

Ministerio de Salud

GOBIERNO DE EL SALVADOR

UNIR, CRECER, INCLUIR

San Salvador, abril de 2014

Ministerio de Salud
Viceministerio de Políticas de Salud
Dirección de Regulación y Legislación Sanitaria
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Documento Derogado

LINEAMIENTOS TÉCNICOS PARA LA REALIZACIÓN DEL CULTIVO BAAR

EL SALVADOR, ABRIL 2014

FICHA CATALOGRÁFICA.

2012. Ministerio de Salud.

Todos los derechos reservados. Está permitida la reproducción parcial o total de esta obra, siempre que se cite la fuente y que no sea para la venta u otro fin de carácter comercial.

Es responsabilidad de los autores técnicos de éste documento, tanto su contenido como los cuadros, diagramas e imágenes.

La documentación oficial del Ministerio de Salud, se puede acceder a través de:
http://asp.salud.gob.sv/regulacion/default.asp

Lineamientos
Tiraje: 1ª. Edición. 2012.
Edición y Distribución
Ministerio de Salud
Viceministerio de Salud de Políticas de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Calle Arce No. 827, San Salvador, Teléfono: 22057000
Página oficial: www.salud.gob.sv
Diseño de proyecto gráfico:
Diagramación:
Impreso en El Salvador por:

Lineamientos técnicos para la realización de Cultivo BAAR

El Salvador. Ministerio de Salud. Viceministerio de Salud de Políticas de Salud. Dirección de Regulación y Legislación en Salud. Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias. San Salvador, El Salvador. C.A.

1. Ministerio de Salud.
2. Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias.

Documento Derogado

AUTORIDADES

Dra. María Isabel Rodríguez
Ministra de Salud

Dra. Elvia Violeta Menjívar
Viceministra de Servicios Salud

Dr. Eduardo Antonio Espinoza Fiallos
Viceministro de Políticas de Salud

Documento Derogado

Equipo Técnico

Nombre	Cargo
Dr. Julio Garay Ramos	Jefe del Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias.
Lic. René Guevara	Técnico del Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias.
Licda. Margarita Ramírez Lemus	Encargada de Sección de Tuberculosis, Laboratorio Nacional de Referencia.
Dr. Víctor Odmaro Rivera Martínez	Director de Regulación y Legislación en Salud.
Dra. Patricia de Muñoz	Técnico de Dirección de Regulación y Legislación en Salud

COMITÉ CONSULTIVO

Nombre	Cargo
Licda. Yanira Emperatriz Meléndez Cortez	Licda. en Laboratorio Clínico, Laboratorio Nacional de Referencia.
Licda. Marta Elena Merino Barquero	Licda. en Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom.
Licda. Rosaura Guadalupe Sánchez Estrada	Licda. En Laboratorio Clínico,Coordinadora del área ácido alcohol resistente, Hospital Nacional Rosales.
Licda. Karen Eugenia Jiménez de Hernández	Licda. en Laboratorio Clínico, Hospital Nacional “José Antonio Saldaña”.
Licda. Felicita López de Torres	Licda. en Laboratorio Clínico, Hospital Nacional Zacamil “Juan José Fernández”.
Licda. Alba Argelia Alfaro	Licda. en Laboratorio Clínico, Centro de Especialidades ISSS.
Licda. Obelinda Cerritos Freund	Licda. en Laboratorio Clínico, Hospital Nacional “Dr. Luis Edmundo Vásquez” .
Licda. Alicia Calderón de Lovo	Licda. en Laboratorio Clínico, Control de Calidad de Baciloscopía, Hospital General ISSS.
Licda. Ana María de Mendoza	Supervisora en Laboratorio Clínico, Región Metropolitana de Salud.
Licda. Eda Carolina Díaz de Urey	Licda. en Laboratorio Clínico, Hospital Nacional de Santa Ana “San Juan de Dios”.
Licda. Herminia Vásquez	Supervisora en Laboratorio Clínico, Región Paracentral de Salud.
Lic. José Ricardo Hernández Franco	Lic. en Laboratorio Clínico Hospital Nacional de San Miguel “San Juan de Dios”.

Documento Derogado

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.	8
II. OBJETIVOS.	9
III. BASE LEGAL	10
IV. ÁMBITO DE APLICACIÓN	10
V. MARCO CONCEPTUAL Indicaciones de cultivo para el manejo de pacientes con Tb	11
VI. DESARROLLO DEL CONTENIDO Fundamentos de los procedimientos utilizados en el cultivo de Mycobacterium tuberculosis	12
VII. ELECCIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO SEGÚN REGISTROS DISPONIBLES a) Método de Ogawa Kudoh b) Método de Ogawa Modificado c) Método de Petroff	17
VIII. ACTIVIDADES DEL CULTIVO SEGUN RIESGO a) Tareas de bajo riesgo b) Tareas de riesgo medio c) Tareas de riesgo mayor	23
IX. ÁREA DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL CONTAMINADO	28
X. TOMA, RECEPECIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS	29
XI. ORGANIZACIÓN DEL MATERIAL Y MUESTRA DEL CULTIVO BAAR a) Preparación de las muestras para cultivo BAAR b) Concentración de muestras líquidas o semiliquidas c) Revisión y lectura de las muestras cultivadas d) Selección de los cultivos positivos para identificación y prueba de sensibilidad	30
XII. CONTROL DE CALIDAD a) En el control de calidad interno deben realizarse las siguientes acciones.	36

Documento Derogado

b) Aspectos esenciales a tomar en cuenta cuando se realiza el control de calidad interno en cultivo **c) Registro de elaboración, recepción, control y consumo de medios de cultivo** **d) Control interno en la calidad de los registros** **e) Análisis de la demora en la entrega de informes** **f) Control de calidad externo**	
XIII. DISPOSICIONES GENERALES.	**40**
XIV. ANEXOS.	**42**
XV. BIBLIOGRAFÍA.	**5[illegible]**

Documento Derogado

I. Introducción.

Una de las herramientas más importantes en la prevención y control de la tuberculosis, es la realización de los cultivos para el Aislamiento de los Bacilos Ácido Alcohol Resistente, en adelante cultivo BAAR, que permiten la identificación etiológica, tratamiento y el control de la enfermedad, ya que mejora la eficiencia en la detección, debido a su sensibilidad y especificidad, por lo cual constituyen una herramienta indispensable para la identificación del *Mycobacterium tuberculosis* mediante cultivo, así como para la vigilancia epidemiológica de las cepas resistentes y multidrogo-resistentes.

Los presentes Lineamientos técnicos establecen las disposiciones necesarias para la realización y procesamiento de los cultivos de BAAR; se detallan los procedimientos para incrementar la calidad del cultivo y la bioseguridad en el trabajo. Además establecen el control, vigilancia y monitoreo, aplicando los procesos que permiten la garantía de calidad en la realización de los cultivos BAAR.

Este instrumento técnico jurídico permitirá la estandarización a nivel nacional de las técnicas necesarias para la realización de los cultivos BAAR, por lo cual deben ser aplicados por el personal de laboratorio clínico en los establecimientos de la Red Integral e Integrada de Servicios de Salud, en adelante RIISS.

Documento Derogado

II. Objetivos

Objetivo general.

Homologar las técnicas de aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis,* realizadas en los laboratorios en los establecimientos de la RIISS que procesan cultivos BAAR, a fin de contribuir al diagnóstico, control y tratamiento oportunos de las personas con tuberculosis.

Objetivos específicos

1. Proporcionar al personal de laboratorio clínico una herramienta técnica que establezca los procedimientos estandarizados para la realización de los cultivos BAAR.

2. Incrementar la detección de casos y sobrevida en los pacientes inmunosuprimidos y de difícil diagnóstico.

3. Establecer las disposiciones necesarias para el cumplimiento de las medidas de bioseguridad en el manejo de las muestras y cultivos BAAR para la protección del personal de salud y del medio ambiente.

Documento Derogado

III. Base Legal.

- Que de acuerdo a los Artículos 149, 150, 151 y 152 del Código de Salud los cuales prescriben que para el control de la tuberculosis se dictarán las normas y se acordarán las acciones que en forma integrada; tendrán por objeto la prevención de la enfermedad, diagnóstico, localización, el adecuado tratamiento, control y rehabilitación de los enfermos.
- Que de conformidad a la Política Nacional de Salud 2009-2014 en su línea de acción número 8.2 específica que el Sistema Nacional de Salud garantizará el derecho de la población a la atención integral a la salud mediante actividades organizadas en planes y programas orientados de acuerdo a criterios poblacionales, vulnerabilidad, riesgo, morbilidad, mortalidad, solidaridad y equidad.
- Que con base a los considerandos anteriores y tomando en consideración la trascendencia en Salud Pública, que tiene la prevención y control de la tuberculosis es necesario emitir los Lineamientos técnicos que contribuirán en el diagnóstico de las poblaciones de difícil detección.

IV. Ámbito de aplicación.

Están sujetos al cumplimiento de los presentes Lineamientos técnicos, el personal de los laboratorios clínicos de los establecimientos de la RIISS.

Documento Derogado

V. Marco Conceptual.

La baciloscopía es el examen que se realiza para la detección del bacilo de la tuberculosis en adelante Tb; se utiliza en los casos infecciosos, para evaluar la mejoría clínica del paciente, hasta su curación o detectar un posible fracaso al tratamiento. Sin embargo la baciloscopía tiene una sensibilidad baja comparada con otro método diagnóstico, el cultivo BAAR la complementa. Mediante el cultivo se ponen en evidencia bacilos viables presentes en escasa cantidad; se pueden caracterizar para verificar la identificación específica del bacilo de la Tb y conocer su sensibilidad y patrón de resistencia a los medicamentos antituberculosos.

Otros métodos, aún no han logrado sustituir a la detección, identificación y prueba de sensibilidad dependientes del cultivo. Este puede ser realizado en laboratorios con medianos recursos y mantiene su posición como método de referencia por su precisión.

El cultivo produce resultados tardíamente, sin embargo presenta mayor sensibilidad que la baciloscopía, ya que puede evidenciar hasta un mínimo de diez bacilos ácido alcohol resistente presentes en una muestra, si es realizado en forma correcta, permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos.

Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación de diagnóstico de la Tb en aproximadamente 15 a 20% del total de casos y en 20 a 30% de los casos de Tb pulmonar. Si se considera el total de casos con diagnóstico de Tb pulmonar confirmado bacteriológicamente, la baciloscopía detecta del 70 al 80% y el cultivo del 20 al 30%. Entre los casos con Tb extrapulmonar el aporte del cultivo al diagnóstico es variable, según la localización de la enfermedad y aun con un resultado negativo del cultivo, es posible que se establezca o se mantenga el diagnóstico de Tb.

Indicaciones de cultivo para el manejo de pacientes con Tb.

Se deben indicar cultivos en los siguientes casos:

- Alta sospecha de Tb con baciloscopía negativa.
- Tb infantil.

Documento Derogado

- Tb extrapulmonar.
- Personas con VIH y sospecha de Tb.
- Pacientes con baciloscopía de uno a nueve bacilos en cien campos.
- Fracaso al tratamiento.
- Abandono recuperado.
- Recaída.
- Contacto con un paciente con Tb multidrogoresistente.
- Antecedente o estancia actual en Centro Penintenciario.
- Coinfección Tb/VIH.
- Ausencia de negativización al segundo o tercer mes de tratamiento.
- Persona migrante nacional o extranjera con sospecha de Tb.
- Caso crónico de Tb.
- Paciente sintomático respiratorio en adelante SR, con diabetes y con baciloscopía negativa (Método de Ogawa-Kudoh).
- Paciente SR con una serie de baciloscopías negativas pero con sospecha de Tb, que son contactos de pacientes con Tb en cualquiera de las formas. (Método de Ogawa-Kudoh, anexo 5).

Documento Derogado

VI. Desarrollo del contenido.

Servicios de cultivo en la red de laboratorios.

Los laboratorios de las Unidades Comunitarias de Salud Familiar (UCSF), que realizan baciloscopía deben establecer coordinación con el laboratorio de la red más cercana para enviar las muestras que requieren ser cultivadas. Los laboratorios que realicen cultivos BAAR deben establecer coordinación con el Laboratorio Nacional de Referencia en adelante LNR, para derivar los aislamientos que requieran ser identificados o realizar la prueba de sensibilidad.

Fundamentos de los procedimientos utilizados para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis.*

El personal de laboratorio mediante el cultivo debe asegurar que los bacilos en las muestras de los pacientes se multipliquen in vitro, hasta que se visualicen formando colonias en un medio sólido, para ello en cada una de las etapas del proceso del cultivo, debe verificarse:

a) Persistencia del bacilo en muestra de la lesión.

El personal de laboratorio para procesar la muestra de la lesión debe realizar las siguientes actividades:

- Tener en cuenta que la probabilidad de recuperación aumenta proporcionalmente con la rapidez con que se siembre la muestra de la lesión del paciente.
- Tomar en cuenta el tiempo de demora en la reproducción del bacilo, ya que esta etapa 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.
- Investigar el retraso que haya sufrido la siembra de muestras de esputo que contienen alto número de bacilos (baciloscopía positiva), debido a que en algunos casos, se han obtenido cultivos positivos reportados, hasta quince días después de la recolección de la muestra.
- Verificar factores claves como la exposición a la luz solar, desecación y el calor ya que son condiciones micobactericidas.
- Vigilar condiciones tales como: temperaturas muy bajas, viabilidad, y los períodos de tiempo de cultivo, ya que en los periodos cortos, puede ser preservada entre 2 a 4°C, y en los períodos de tiempo largo a -70°C.

Documento Derogado

b) Resistencia del bacilo a agentes contaminantes.

El personal de laboratorio para contrarrestar la resistencia del bacilo a los contaminantes debe realizar las siguientes actividades:

- Procesar las muestras de forma adaptada a la modalidad de tiempo de crecimiento del bacilo de la Tb, el cual se divide cada dieciocho a veinticuatro horas.
- No Aislar al bacilo de la Tb inoculando muestras directamente en placas con medios de cultivo y seleccionando colonias por su morfología. Con este procedimiento, los microorganismos comunes acompañantes ocupan el medio de cultivo en pocas horas impidiendo que aparezca el bacilo de la tuberculosis.
- Realizar un tratamiento especial para aislar el bacilo de la tuberculosis u otras micobacterias, si las muestras contienen microorganismos comunes y no han sido decontaminadas.
- Homogenizar las muestras densas, como los esputos y eliminar la flora acompañante mediante un proceso de decontaminación, realizándolo generalmente con una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH).
- Ser estrictamente preciso al preparar la solución decontaminante y al controlar el tiempo de contacto con ella, para preservar la viabilidad del bacilo de la Tb.
- Disminuir en primer lugar, el tiempo de contacto con el decontaminante, para incrementar la recuperación de cultivo BAAR en una muestra de investigación.
- Disminuir la concentración de NaOH y verificar que no resulte un aumento del porcentaje de cultivos contaminados por arriba del 5% que es el nivel considerado aceptable.
- Utilizar la técnica anterior, en laboratorios que procesan muy cuidadosamente y sin demoras las muestras el mismo día en que son tomadas.
- Asegurar la esterilidad durante todos los procedimientos de toma y procesamiento de la muestra, ya que de otra forma, se perderá material valioso y de difícil obtención por contaminación del cultivo.
- Neutralizar la muestra decontaminada con NaOH y agregar una solución ácida gota a gota hasta que vire un indicador de pH. Este proceso debe ser controlado muy cuidadosamente, cualquier defecto o exceso de la solución ácida origina un pH ácido no apto para el desarrollo del bacilo.

Documento Derogado

c) Concentración de los bacilos.

- El personal de laboratorio debe inocular un volumen de 0.1 a 0.5 mililitros de muestra en cada tubo con medio de cultivo.
- Sedimentar por centrifugación para concentrar en ese inóculo la mayor parte de BAAR presentes en una muestra.
- La precipitación debe ser suficientemente fuerte para evitar que se pierdan muchos bacilos en el sobrenadante, que es descartado, y evitar de esta forma que la potencia del cultivo para detectar bacilos sea escasa.

d) Requerimientos para el desarrollo del bacilo in vitro.

Nutrientes en los medios de cultivo:

Para aislar bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*, el personal de laboratorio debe utilizar un medio que contenga glicerol como fuente de carbono, asparagina y iones de amonio, como fuente de nitrógeno y micronutrientes. Otro componente esencial para el desarrollo del bacilo es la albúmina, incorporada en los medios de cultivo con el agregado de huevos de gallina.

Condiciones y tiempo de incubación.

- Para que el tiempo en el que se detecta un cultivo positivo, sea efectivo, debe utilizarse un método de decontaminación enérgico, un medio de cultivo propicio para el crecimiento y el inóculo debe quedar con pH balanceado.
- La temperatura: el *Mycobacterium tuberculosis* se ha adaptado 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.
- El personal de salud para el tiempo de incubación debe tomar en cuenta las características propias de algunas cepas del bacilo, de la cantidad de bacilos que haya en la muestra, del tipo de lesión y del tiempo durante el cual se ha administrado tratamiento antituberculoso al paciente.

Documento Derogado

- El tiempo en el que se detecta un cultivo positivo depende de lo enérgico del método de decontaminación aplicado, del pH al que haya quedado el inóculo luego del tratamiento, de la riqueza del medio de cultivo y de que este 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 d bacilos que haya en la muestra de la lesión y del tiempo durante el cual se ha administrado tratamiento antituberculoso al paciente.
- Además debe tomarse en cuenta que los tiempos de incubación de cada cepa son variables ya que existen cepas de bacilos multirresistentes que se multiplican con más dificultad, parte de las muestras con baciloscopías 3+; evidencian desarrollo las primeras semanas de incubación en medios a base de huevos y las muestras con escasos bacilos, no detectables por baciloscopía, sus colonias crecen lentamente, aproximadamente hasta ocho semanas después de la siembra en medios a base de huevos.
- El bacilo es aerobio estricto y por eso debe quedar atrapada una atmosfera de oxigeno dentro del tubo, vial, botella o placa.

f) Riesgo biológico inherente a los procedimientos

- El personal de laboratorio respecto a la técnica del cultivo BAAR, debe cumplir estrictamente las disposiciones de medidas de bioseguirdad, durante la agitación y centrifugación de tubos las cuales generan aerosoles infecciosos; ya que el riesgo es mayor cuanto mayor sea la carga de bacilos que contenga la muestra.

g) Contaminación cruzada

El personal de laboratorio debe evitar las siguientes situaciones que pueden dar una contaminación cruzada:

- Transferencia de microorganismos, de una muestra a otra al ser procesadas en serie en el laboratorio.
- Sobrecarga de trabajo, alta frecuencia de muestras con baciloscopía positiva en la rutina, los procedimientos poco rigurosos, utilización de reactivos no alicuotados, son condiciones propicias para este tipo de contaminación en laboratorio.

Documento Derogado

h) Cuantificación del desarrollo de *Mycobacterium tuberculosis*

Para la cuantificación del desarrollo en medios sólidos del bacilo se debe cuantificar la muestra utilizando una escala semicuantitativa que es reproducible y que expresa la cantidad de bacilos detectado permitiendo evidenciar variaciones significativas de esa cantidad. Por lo tanto es indicativa del grado de avance y evaluación de la enfermedad.

VII. Elección del método de cultivo según los recursos disponibles

La elección del método a emplear debe resultar de un análisis riguroso y realista de:

- El presupuesto regular y continuo del laboratorio en donde se pretende implementar el cultivo.
- El entrenamiento del personal y equipamiento del laboratorio.
- La asistencia técnica que tienen los equipos necesarios en el lugar donde se aplica el método.

a) Método de Ogawa Kudoh.

El personal de laboratorio debe utilizar la técnica de la siguiente manera:

- Para confirmar el diagnóstico de TB pulmonar en casos con baciloscopía negativa por su sensibilidad.
- Para recuperar los bacilos de esputos de pacientes bacilíferos que requieren prueba de sensibilidad.
- Utilizar hisopos para tomar y procesar la muestra a sembrar y medios a base de huevo con pH ácido.
- Genera riesgo biológico similar al de la baciloscopía pues no requiere centrifugación de suspensiones con bacilos.

b) Método de Ogawa Kudoh modificado.

- Debe utilizarse sólo para procesar esputos en laboratorios sin equipamiento adecuado o suficiente para aplicar la técnica de Petroff. Si no se dispone de cabina de seguridad

Documento Derogado

- biológica, deben aplicarse las prácticas y medidas de bioseguridad recomendadas para la realización de la baciloscopía.
- Requiere un hisopo estéril de quince milímetros de longitud en promedio y un tubo de vidrio estéril conteniendo tres mililitros de solución de NaOH al 4% por cada muestra a procesar.
- Abrir el primer envase. Elegir y recolectar con el hisopo las partículas útiles, mucopurulentas del esputo adhiriéndolas al hisopo estéril. Cerrar el envase.
- Sumergir el hisopo estéril en un tubo con tres mililitros de solución de NaOH al 4% durante dos minutos.
- Retirar el hisopo sin escurrir y sembrar con él un tubo con medio de Ogawa acidificado, con movimientos de rotación y presión. Repetir el procedimiento con el segundo tubo, utilizando el mismo NaOH al 4%.
- Descartar el hisopo en un recipiente destinado a ser esterilizado en el autoclave.
- Inclinar los tubos inoculados en la forma descrita.

c) Método de Petroff

- Debe utilizarse en la homogenización, decontaminación del BAAR y su inoculación se realiza en medios a bases de huevos con pH cercano al neutro.
- Es el más conveniente, teniendo en cuenta la situación de la mayor parte de los laboratorios que realizan cultivo (anexo 4).

Decontaminación y concentración por el Método de Petroff.

- Verificar que la primera serie de muestras a decontaminar no supere la capacidad del rotor de la centrifuga. Tener en cuenta que el tiempo de contacto con el decontaminante no puede exceder en total los treinta minutos, de manera que normalmente no es posible procesar series de más de doce muestras. Operar con serenidad y con movimientos suaves pero ininterrumpidamente, para evitar que el tiempo de contacto con el decontaminante se prolongue.

Documento Derogado

- Abrir el primer envase conteniendo una muestra de esputo. Trasvasar todo su contenido en el tubo de centrifuga que le corresponde, con un movimiento muy suave y seguro, o transferirlo con un gotero.
- Tapar el envase y el tubo de centrífuga.
- Proceder de la misma manera con las siguientes muestras, una por una. No abrir un envase ni un tubo de centrifuga sin haber cerrado antes los anteriores.
- Agregar NaOH 3.5% hasta duplicar el volumen de la muestra.
- Dejar actuar el decontaminante por veinte minutos, agitando manualmente cada cinco minutos.
- Neutralizar con HCl 1N y con NaOH al 2% a cada muestra.
- Verificar que todos los tubos estén cerrados herméticamente.
- Trasladar la gradilla conteniendo los tubos hasta la centrífuga y ubicar cada tubo dentro de un portatubos del rotor y balancear con un tubo de igual volumen en la posición opuesta. Si no se encuentran dos tubos de igual volumen, se debe ubicar en frente un tubo con el volumen necesario de agua destilada para nivelar y luego tapar el rotor con la tapa de bioseguridad.
- Centrifugar quince minutos a 3000 gravedades de 25 a 35°C.
- Dejar reposar los tubos cinco minutos luego de detenida la centrífuga.
- Abrir la tapa de la centrifuga. En caso de sospechar o comprobar algún derrame dentro del contenedor de tubos, se debe esterilizar en el autoclave con su tapa de seguridad; de lo contrario, se debe retirar muy cuidadosamente, tratando de no resuspender el sedimento, trasladarlo tapado, junto con la gradilla a la cabina y destaparlo. Retirar los tubos y ubicarlos en orden según su número en la gradilla con cuidado de no resuspender el sedimento.
- Comprobar que los procedimientos hayan sido realizados con agilidad suficiente como para que el tiempo total de contacto con el decontaminante no exceda los treinta minutos.
- Abrir cada tubo, descartar suavemente el sobrenadante dentro del recipiente destinado a este fin, sin salpicar ni mojar la parte exterior del tubo. Limpiar el exterior del tubo con papel toalla o algodón impregnado en hipoclorito al 1% o fenol al 5%, sí eventualmente

Documento Derogado

se moja la pared, descartar el papel toalla o algodón dentro de la bolsa destinada a descartar tubos.

- Proceder de igual forma con todos los tubos centrifugados. No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado previamente el anterior.
- Comprobar el cierre hermético de las tapas de todos los tubos manipulados.

Inoculación de los medios de cultivo.

El personal de laboratorio para la inoculación debe:

- Abrir el primer tubo de centrífuga y descartar el sobrenadante.
- Agregar con un gotero cuatro a cinco gotas de agua destilada estéril al sedimento.
- Homogenizar el sedimento, sembrando entre 0,2 y 0,5 ml (dos a cinco gotas) en cada tubo con medio de cultivo identificado con el número de la muestra. Cerrar el tubo de centrifuga.
- Colocar una gota del sedimento homogenizado en un porta objeto para realizar el extendido
- Proceder de igual forma con cada tubo conteniendo las muestras procesadas. No abrir un tubo sin haber cerrado el anterior. Descartar el gotero utilizado con cada muestra antes de pasar a la siguiente.
- Acondicionar el material destinado a ser esterilizado en el autoclave.
- Asegurar el cierre hermético de la tapa de cada tubo de centrífuga y ubicar dentro del recipiente destinado a esterilizar en el autoclave el material a reciclar, el recipiente conteniendo los sobrenadantes, morteros, pinzas, goteros y tubos utilizados para procesar muestras.
- Dejar la cabina de seguridad funcionando durante cinco minutos para purgar el aire contaminado, apagar el flujo laminar y encender la luz ultravioleta durante treinta minutos.
- Apagar la luz ultravioleta y sacar el material contaminado para ser esterilizado en el autoclave.
- Limpiar la cabina de seguridad y decontaminar con papel toalla o algodón impregnado en etanol al 70% o fenol al 5%, la superficie de trabajo dentro de la cabina, sus paredes

Documento Derogado

laterales y la ventana, luego depositar el papel toalla o algodón en el recipiente conteniendo material para esterilizar en el autoclave y descartar.

Incubación de los tubos inoculados.

- Inmediatamente después de terminada la siembra y acondicionado el material a esterilizar en el autoclave, trasladar la gradilla conteniendo los tubos con siembras hacia la mesa donde se encuentran la(s) bandeja(s).
- Tomar el primer tubo inoculado, distribuir la siembra en toda la superficie del medio sólido, aflojar ligeramente el cierre de la tapa para permitir intercambio de gases y la absorción de la siembra, ubicar el tubo en la bandeja inclinada.
- Proceder de igual forma con cada tubo en el que se hayan realizado siembras.
- Trasladar y ubicar la bandeja a la estufa de incubación a 35 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.
- Ubicar las bandejas en la estufa de acuerdo al numero correlativo, facilitando su revisión durante el seguimiento de los cultivos y registro de resultados.
- Verificar que las bandejas no sobresalgan de los estantes, que los tubos estén perfectamente contenidos en sus bandejas, y que estas no se sobreponga, para evitar accidentes graves.
- Decontaminación de áreas de trabajo y equipos.
- Decontaminar con hipoclorito de sodio al 1% o fenol, las mesas del laboratorio utilizadas, el rotor y los vasos de la centrífuga.
- Quitarse los guantes revirtiéndolos y colocarlos en el recipiente con material a esterilizar en el autoclave y desechar.
- Lavarse las manos.
- El material potencialmente contaminado así acondicionado debe ser esterilizado en el autoclave durante una hora a 121°C.
- Realizar la lectura e informe de resultados de las baciloscopías realizadas al cultivo BAAR.
- Seguir los pasos detallados en el respectivo Manual de procedimientos.

Documento Derogado

VIII. Actividades del Cultivo BAAR según el riesgo.

En lo que se refiere a las tareas internas del laboratorio se debe:

- Agrupar tareas según el nivel de riesgo.
- Encontrar la mejor ubicación posible para cada categoría de tareas en el espacio disponible.
- Establecer una organización que asegure una ruta lógica, sin obstrucciones y segura del material más peligroso.
- Las tareas con distinto nivel de riesgo deben ser ubicadas convenientemente para que se direccione el material potencialmente infeccioso desde un área de riesgo mediano a otra de mayor riesgo. Esta última área debe estar muy bien separada, y allí se intensificará la extracción de aire, los cuidados en el trabajo cotidiano, las medidas de contención del riesgo y de contingencia para accidentes.

El riesgo se divide en tres niveles, las actividades que debe realizar el personal de laboratorio se describen a continuación:

a) Tareas de bajo riesgo.

Las tareas de muy bajo riesgo biológico deben ser seleccionadas para no exponer innecesariamente al personal que las realiza y cuidar el ambiente y deben ser las siguientes:

- Administración del laboratorio, preparación y almacenamiento de materiales, reactivos, medios de cultivo.
- Lavado y reciclado de material de vidrio que periódicamente se esteriliza en autoclave.
- Deben ser realizadas en áreas ¨limpias¨ donde no ingresan pacientes, muestras, cultivos positivos, ni elementos utilizados en el área de procesamiento de muestras sin que antes hayan sido esterilizados.
- Deben ser centralizadas por unidades que asistan no sólo al diagnóstico de Tb sino a varios servicios del laboratorio.
- En el área de lavado y reciclado de material de vidrio se requiere lavabo y mesas amplias, autoclave y estufa (preferentemente de esterilización).

Documento Derogado

- En el área de preparación de medios de cultivo y reactivos se requiere: mesa, balanza, pH-metro, coagulador y refrigerador con capacidad suficiente para almacenar los medios y reactivos que necesitan ser mantenidos a temperatura cercana a los 4°C.
- El lavado, reciclado de material, preparación de medios y reactivos pueden ser ubicados en un mismo laboratorio de ser necesario y sí el espacio es suficiente para albergar ambas actividades.

b) Tareas de riesgo medio.

El personal de salud en el riesgo mediano debe seguir lo siguiente:

- Ingresar las muestras.
- Examen microscópico de los extendidos.
- Se debe seleccionar para estas áreas mesas, sillas, armarios, estantes y mobiliario que puedan ser decontaminados con solución de hipoclorito de sodio.
- Si se dispone solamente de mobiliario de madera, debe ser pintado con pintura impermeable que resista la acción de los decontaminantes.
- Para permitir la limpieza y desinfección, se debe dejar espacio alrededor de muebles, equipos y no se debe almacenar material directamente sobre el piso.
- En esta zona de riesgo mediano deben ingresar el material de vidrio reciclado, medios de cultivo y reactivos necesarios para el procesamiento de muestras.
- Deben recibirse en el riesgo mediano las muestras verificando su consistencia y la identificación de los envases de la muestra con las solicitudes.

c) Tareas de mayor riesgo

En esta etapa el personal de laboratorio debe realizar las siguientes actividades:

- Procesar las muestras y aislamientos de *Mycobacterium tuberculosis.*
- Esterilizar el material potencialmente infeccioso.
- Para las áreas dedicadas a estas tareas también se requiere mobiliario e instalaciones que puedan ser decontaminados con solución de hipoclorito de sodio al 0.5 %.

Documento Derogado

- En esta etapa el área donde serán procesadas las muestras debe estar contiguo al área de ingreso de material, y preferentemente antecedido por una antecámara.
- Debe ser de acceso restringido al personal técnico y personal del laboratorio.

Los requerimientos mínimos para la etapa de mayor riesgo son:

- Muros íntegros desde el piso hasta el techo, de manera que el aire no salga de esta área cuando la puerta esté cerrada.
- Puertas y ventanas con cierre hermético para evitar filtraciones de aire y brindar seguridad contra actos de vandalismo.
- Debe contar con un panel de vidrio en puerta que permita visión desde afuera.
- Superficies de pisos, paredes, techo y mesas de material no poroso, lisas y selladas, cubiertos con materiales y pinturas que resistan el tratamiento con solución de hipoclorito de sodio y eventualmente con fenol al 5%.
- Debe ser de fácil acceso al área de decontaminación de materiales.
- Debe contar con excelente iluminación, agua corriente, gas y electricidad.
- Debe contar con un lavabo para hacer coloraciones y otra para el lavado de manos (preferentemente ubicada cerca de la salida del área).
- Debe contar con dos mesas (una para la preparación de frotis y otra para la lectura de cultivos).
- Espacio suficiente para ubicar una centrifuga, estufa de incubación, refrigerador amplio (preferentemente dos, uno para material limpio y otros para muestras y aislamientos) y cabina de seguridad biológica.
- Aire acondicionado independiente.
- Debe contar con un sistema de extracción de aire. Cada extractor debe ser ubicado a la mayor altura posible, en la pared opuesta a la puerta de ingreso y deben expulsar el aire hacia un área abierta, no transitada, lejos de edificios ocupados.
- Al elegir el sistema de extracción de aire se debe considerar que debe renovar el aire al menos seis veces por hora.
- La cabina de seguridad biológica filtra y retiene a los bacilos que pueden quedar suspendidos en las operaciones de mayor riesgo.

Documento Derogado

- La cabina de bioseguridad debe estar ubicada en un lugar donde la circulación de personal sea la indispensable y lejos de puertas y ventanas que se abran. Conviene dejar un espacio de alrededor de treinta centímetros libres alrededor del equipo para poder acceder durante las tareas de control y mantenimiento.
- Cuando se utilizan cabinas de seguridad biológica, no es indispensable tener un sistema de extracción de aire, aunque lógicamente es conveniente. La extracción puede ser realizada por la misma cabina mientras está en funcionamiento, expulsando el aire a través del ducto hacia el exterior. El técnico que la instale debe asegurar que no exista recirculación de aire hacia el interior del laboratorio por este ducto.
- Las centrífugas de mesa deben estar a una altura cómoda para que pueda verse el rotor y para operar sin dificultad.
- El personal debe protegerse con batas de uso exclusivo para esta área, que se pondrán al ingresar y deben quitarse al terminar sus tareas y salir. Es necesario entonces organizar un área de percheros y estantes para ordenar la ropa de trabajo en la antecámara, separando la ropa limpia de la utilizada.
- Las áreas de mayor riesgo deben contar con lámparas de luz ultravioleta ya que son útiles para completar la desinfección de superficies cercanas y de mayor riesgo de contaminación.

IX. Área de esterilización de material contaminado

Es el área en la cual se ubican los autoclaves utilizados para decontaminar muestras, sobrenadantes que deben ser desechados y el material de vidrio utilizado con material (potencialmente) infeccioso que debe ser reciclado (tubos, pipetas) y debe reunir las siguientes características:

- Debe ser fácilmente accesible desde el área de procesamiento de muestras de manera que no sea necesario transportar el material contaminado a grandes distancias o a través de escaleras/ascensores. Lo ideal es que esté en un cuarto contiguo al área de procesamiento de muestras, comunicado por una puerta distinta a la de ingreso de muestras y material.

Documento Derogado

- El material que debe ser reciclado y las muestras deben seguir un recorrido en una única dirección, de la siguiente manera: área de ingreso, área de procesamiento y área de decontaminación.
- Posterior a la esterilización, el material desechable que no genera riesgo biológico debe procederse a su descarte aplicando los instrumentos técnicos jurídicos vigentes.
- El material de vidrio reciclable, esterilizado y sin riesgo, debe ser trasladado al área de lavado/preparación/esterilización la cual debe estar ubicada en forma contigua a la de esterilización de material.

X. Toma, recepción, conservación y transporte de las muestras.

- Las normativas concernientes a bioseguridad, momento, forma de recolección y número de muestras a recolectar según la localización de la lesión, han sido descritas en el respectivo Manual de procedimientos de Tb por microscopía directa.
- El personal de laboratorio debe: facilitar, agilizar la recepción de muestras, preservar, asegurar su correcta identificación, registrar en el libro del laboratorio, la bioseguridad durante su manipulación y de ser necesario el embalaje de las muestras para su transporte.
- En particular, es preciso tener presente que para el cultivo se deben realizar las siguientes actividades: procesar las muestras de contenido gástrico y las extrapulmonares lo mas pronto posible a la recolección. Se debe establecer una coordinación conjunta entre el personal del laboratorio y el equipo médico que toma las muestras.
- Las muestras deben mantenerse en refrigeración a 4ºC hasta el momento de su procesamiento si inevitablemente deban transcurrir más de veinticuatro horas desde la recolección hasta la siembra.
- El personal de laboratorio no debe agregar a las muestras fenol, formol o solución de formaldehído.
- Deben ser evitados algunos anestésicos que tienen actividad antimicrobiana y por lo tanto esta situación debe darse a conocer a los equipos médicos que toman biopsias y siguen procedimientos indicados para estudios histopatológicos.

Documento Derogado

XI. Organización del material y muestras del Cultivo BAAR.

El personal de salud debe sistematizar el trabajo para:

- Minimizar el riesgo biológico y de transferencia de bacilos entre distintos materiales.
- Evitar errores en el procesamiento de la muestra.
- Permitir la trazabilidad de la muestra durante los procedimientos en caso que se presenten dudas sobre los resultados.
- Repetir los procedimientos siempre en el mismo orden en cada día de trabajo. Ordenar los envases de las muestras, tubos y portaobjetos según su numeración.
- Mantener todo el material ordenado durante todo el proceso.

a) Preparación de las muestras para cultivo BAAR.

- Se debe procesar la totalidad de cada muestra para no perder material que pueda contener bacilos. Se debe además, procesar por separado cada muestra del mismo paciente, sin mezclarlas. Esto incrementa la posibilidad de recuperar bacilos, en especial en el caso que alguna de las muestras se contamine. A la vez permite verificar si se reitera el aislamiento a partir de distintas muestras del paciente y así resolver dudas que ocasionalmente se pueden presentar en el diagnóstico de tuberculosis o discernir si se está frente a un caso de micobacteriosis.
- Se aplican distintos procedimientos antes de la siembra según la consistencia, volumen y contaminación de la muestra. El tipo de muestra predominante será seguramente el esputo producido por expectoración espontánea.

b) Concentración de muestras líquidas o semifluidas:

b.1) El personal de laboratorio con las muestras de volumen menor a un mililitro debe:

- Sembrar directamente y en su totalidad las muestras distribuyéndolas en los tubos con medios de cultivo. Sembrar 0.5 mililitros por tubo con medio sólido, para que pueda ser absorbido.
- Ubicar el tubo en el orden que le corresponde en la serie de muestras que serán decontaminadas para que sea procesado mediante la técnica de Petroff.

Documento Derogado

b.2) El personal de laboratorio con las muestras de volumen mayor a cuatro mililitros debe:

- Trasvasar el volumen total de cada muestra a uno o más tubos de centrífuga volcando suavemente el contenido del envase dentro de los tubos.
- Centrifugar quince minutos a 3000 gravedades.
- Esperar que se detenga completamente la centrífuga.
- Retirar los tubos cuidando no resuspender el sedimento, trasladarlos a la cabina. Dejar reposar los tubos cinco minutos antes de abrirlos.
- Abrir el primer tubo centrifugado, descartar su sobrenadante en el recipiente dedicado a este fin con un movimiento suave, sin salpicar, sin tocar la boca del frasco. Limpiar el exterior del tubo con un algodón impregnado en hipoclorito de sodio al 1%, si se hubiere salpicado la pared. Cerrar la tapa del tubo.
- Proceder de igual forma con los siguientes tubos. No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado el anterior.
- Trabajar el sedimento como se explicó en la Método de Petroff.

Maceración de muestras de tejido tomadas por biopsia.

- Trasladar la muestra suavemente a un mortero estéril de porcelana u otro material autoclavable, sin salpicar. Puede ser necesario el auxilio de una pinza estéril para realizar esta operación. Descartar la pinza en el recipiente destinado a descartar pipetas de vidrio.
- Agregar un mililitro de agua destilada y arena estéril dentro del mortero, disgregar el tejido presionando con la mano del mortero y homogenizar el tejido.
- Si el tejido es normalmente estéril y ha sido tomado con asepsia, recoger con una pipeta todo el material macerado, distribuirlo en los medios de cultivo identificados con el número de la muestra.
- Si el tejido contiene contaminantes, recoger con un gotero todo el material macerado, transferirlo al tubo de centrífuga identificado con el número de la muestra que está siendo procesada, ubicar el tubo en el orden que le corresponde en la serie de

Documento Derogado

muestras que serán decontaminadas para que sea procesado mediante la técnica de Petroff.

- Si se trata de un material normalmente estéril pero se ignora si fue tomado y mantenido en esterilidad, utilizar la mitad del macerado para la siembra directa y el resto para decontaminar.
- Ubicar el mortero dentro del papel o bolsa donde fue previamente esterilizado y descartarlo dentro del recipiente destinado a esterilizar en el autoclave el material que se va a reciclar.

C) Revisión y lectura de las muestras cultivadas.

El personal de laboratorio debe realizar las siguientes actividades:

- Control visual periódico de los cultivos.
- Mantener los tubos en incubación hasta las ocho semanas en el caso de medios de cultivo a base de huevos. Revisarlos bajo una fuente de luz que permita observar con claridad hasta las colonias más pequeñas, realizando las siguientes actividades :

c-1) Período de lectura dos-tres días post siembra.

- Verificar si se encuentran indicios de mala neutralización de la muestra.
- Reportar si se detecta contaminación.
- Verificar si la siembra está absorbida y el líquido se ha evaporado.
- Registrar si quedan restos de hidróxido de sodio en el inóculo, esto se verifica si los medios a base de huevos se aclaran hacia un tono amarillento que los diferencia del resto de los tubos con siembras.
- Debe registrarse en el libro del laboratorio si se detecta contaminación en toda la superficie de un tubo del medio sólido, descartar el tubo y continuar el proceso hasta emitir un resultado.
- El personal de laboratorio debe producir de inmediato el informe para comunicar si detecta contaminación o pH inadecuado (viraje hacia al amarillo o verde intenso) en todos los tubos sembrados con la muestra de un paciente. (Ver anexo 12).

Documento Derogado

- Se debe volver a incubar el bacilo de la Tb en la parte no contaminada, si se detectará contaminación sólo en un área pequeña de la superficie de un medio sólido, para dar oportunidad a que desarrolle.
- Si la siembra está absorbida, ajustar la tapa para evitar la desecación del medio.
- 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.

c-2) Período de lectura a los siete días post siembra y luego una vez por semana:

- Identificar tubos contaminados y proceder como se ha descrito anteriormente.
- Un tubo contaminado tardíamente puede enmascarar el desarrollo de *Mycobacterium. tuberculosis,* por lo que antes de descartarlo remitirlo al LNR.
- Identificar los tubos con desarrollo del bacilo de la Tb 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.
- Repetir la lectura cada semana hasta emitir un resultado.

d) Selección de los cultivos positivos para identificación.

Los cultivos en medios sólidos deben reportarse de la siguiente manera:

- Seleccionar los cultivos positivos para su identificación y prueba de sensibilidad.
- En el caso en que el laboratorio no realice la identificación o prueba de sensibilidad, derivar al LNR acondicionando el o los tubos positivos como se detalla en el Manual de procedimientos respectivo.
- Enviar todos los aislamientos obtenidos con distintas muestras del paciente con el fin de verificar si todos corresponden al mismo microorganismo.
- Transcribir el resultado obtenido de los registros del laboratorio en la PCT-3, utilizando la escala anteriormente descrita, cuantificar los resultados positivos. Informar los cultivos positivos y los totalmente contaminados en el mismo dia que son detectados.

Documento Derogado

- Cuando la lectura es visual, informar los cultivos negativos al finalizar la octava semana de incubación de los medios a base de huevos.

Descarte de tubos inoculados.

Descartar los tubos en un recipiente donde serán esterilizados en autoclave durante una hora a 121°C, antes de ser reciclados..

Morfologia de las colonias.

- Descartar los tubos en un recipiente donde serán esterilizados en autoclave durante una hora a 121°C, antes de ser reciclados.
- Las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* son habitualmente rugosas, sin pigmentación, y secas si se ha absorbido bien en el medio la humedad propia de la muestra y las soluciones utilizadas para procesarla.
- Los medios sólidos evidencian el desarrollo de las micobacterias con cierto retardo con relación a los líquidos, pero en cuanto se detecta el desarrollo es posible diferenciar las colonias con características de M. tuberculosis con lo que, si se tiene experiencia, es posible orientar con mucho acierto si se ha aislado el bacilo de la Tb.
- Las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a la isoniacida son más planas y lisas. Cuando el medio de cultivo está muy húmedo, las colonias de cualquier micobacteria aparecen lisas. Entonces si las colonias desarrollan lentamente, no tienen pigmentación, son lisas, pequeñas o brillantes, se presenta la duda acerca de si lo que se ha aislado es una micobacteria ambiental.
- Sin duda alguna es una micobacteria ambiental si se detectan colonias de BAAR con algún tipo de pigmentación (desde ligeramente amarilla hasta anaranjada fuerte) o con abundante desarrollo en medios a base de huevos durante la primera semana de incubación. Muy excepcionalmente *Mycobacterium tuberculosis* puede aparecer tan precozmente si el inóculo es muy alto.

Documento Derogado

- Si se sospecha el diagnóstico de micobacteriosis, se deben enviar al LNR todos los aislamientos obtenidos con distintas muestras del paciente. Está fuera del alcance de este lineamiento la identificación de micobacterias diferentes a las del complejo *Mycobacterium tuberculosis.*

XII. CONTROL DE CALIDAD

a) En el control de calidad interno deben realizarse las siguientes acciones:

- El encargado de laboratorio de mico bacteriología, es el responsable de establecer y analizar los resultados de los controles internos y de realizar las correcciones necesarias cuando se detectan deficiencias.
- Debe utilizar en la rutina de trabajo un sistema de controles regulares y continuos de los puntos críticos.
- Debe realizar la evaluación de: materiales, equipos, reactivos, el desempeño del personal, los procedimientos, la precisión y oportunidad de los informes, la aplicación adecuada del cultivo y el rendimiento del cultivo.
- Debe proporcionar el seguimiento de los resultados de los controles de calidad.
- Debe aplicar las medidas correctivas cuando la imprecisión del resultado excede los límites considerados aceptables o se producen demoras evitables.

b)Aspectos esenciales a tomar en cuenta cuando se realizan el control de calidad interno en medios de cultivo:

Los controles son necesarios cuando se prepara el medio en el laboratorio verificándose lo siguiente:

- En el aspecto debe tomarse en cuenta el color en tubos de un mismo lote que presentan distinta intensidad de verde y que evidencian mala homogenización o residuos en los tubos. Un verde muy oscuro evidencia exceso de verde de malaquita o pH muy ácido. Medios muy amarillentos pueden indicar defecto de verde de malaquita o pH muy alcalino.

Documento Derogado

- En la consistencia debe tenerse en cuenta que: si el medio se desintegra fácilmente, la temperatura de coagulación no es suficiente. Esto puede ser constatado golpeando sobre la mano uno o dos tubos extraídos al azar del equipo de coagulación. Los tubos con poca consistencia no son adecuados para hacer repiques.
- En cuanto a la textura/homogeneidad debe evitarse la formación de burbujas al dispensar y si aparecen luego de coagular, es posible que el medio haya estado sometido a temperatura excesiva y por lo tanto haya perdido calidad. Tampoco deben verse grumos, indicadores de mala homogenización.
- El LNR debe realizar el control de sensibilidad para detectar problemas graves sembrando una dilución 1/10.000 de una suspensión de bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* con turbidez igualada a la de una suspensión comparada con la escala McFarland N° 1 conteniendo 1 mg/ml. Inocular 0,2 mililitros en cada uno de cinco tubos de medio de un lote anterior, y en cinco tubos del lote nuevo, tomados al azar. Si el número de colonias obtenidas en el lote recién preparado (o recién adquirido) es significativamente menor al obtenido con el lote tomado como referencia, la sensibilidad es inadecuada.
- Los laboratorios que preparan medios de Löwenstein Jensen en el país, deben realizar un control de sensibilidad que consiste en sembrar regularmente las muestras respiratorias de diagnóstico con baciloscopía positiva aunque el cultivo no sea necesario para el paciente. La positividad del cultivo (en escala de cruces) debe ser igual o mayor a la positividad de la baciloscopía (también en escala de cruces).
- Debe observarse esterilidad absoluta, después de incubar cuatro tubos tomados de cada nuevo lote al azar, a 37°C durante cuarenta y ocho horas y tampoco luego de dejarlos cuarenta y ocho horas adicionales a temperatura ambiente.

Registro de elaboración o recepción, control y consumo de medios de cultivo.

- Todos los laboratorios de la red que preparan medios de cultivo deben llenar el formulario para mantener este registro que permite individualizar lotes deficientes

Documento Derogado

y descartarlos, seguir la calidad de los mismos y cuantificar el consumo del laboratorio, este formulario se presenta en el anexo 10.

- Para medios a base de huevos, a los veinte días de incubación se podrá decidir si el control de sensibilidad proporciona resultados satisfactorios. En caso contrario, se identificará el material sembrado en él, desde que fue puesto en uso, se anularán los resultados negativos que se obtengan con ese lote y se repetirán los cultivos que quedaron comprometidos.
- El responsable del área una vez al mes controlará que se estén cumpliendo los procedimientos adecuados en la preparación, conservación de reactivos y medios; además deberá controlar el proceso de esterilización usando indicadores de temperatura.

d) Control interno de la calidad de los registros.

El responsable del laboratorio debe:

- Disponer de un profesional no involucrado en la realización e informe del cultivo, los datos y resultados consignados en los informes elaborados ese día coincidan exactamente con los registrados en el Libro del Laboratorio. Esto puede ser realizado por el responsable del laboratorio en el caso en que él mismo no procese e informe muestras.
- Verificar que se procesen las muestras los días establecidos en la rutina de trabajo para ácido resistente y que no se detecten demoras mayores a los tres días de tomadas las muestras.
- Que hayan sido derivados para identificación y prueba de sensibilidad los aislamientos de los pacientes que lo requieran, de acuerdo a lo establecido en los presentes Lineamientos técnicos.
- Control interno de los resultados del cultivo.
- Muestra con baciloscopía positiva y con cultivo negativo.

Documento Derogado

El personal de laboratorio debe investigar:

- Si la muestra ha sido tomada para control de tratamiento. En este caso, el resultado puede reflejar simplemente que el paciente está eliminando bacilos muertos o no viables lo que indicaría que el tratamiento es efectivo.
- Si la muestra ha sido tomada para diagnóstico. En este caso, se debe verificar si este tipo de resultado se repite y simultáneamente se investigará si la sensibilidad del lote del medio en uso resultó buena, si la concentración del decontaminante y el tiempo de tratamiento con él son los normalizados, y si la temperatura de la estufa de incubación no excedió el límite aceptable. Puede tratarse también de un error en la obtención o trascripción de la información acerca de la historia de tratamiento del paciente.
- Muestra contaminada.

El personal de laboratorio debe investigar:

- Si transcurrió un tiempo excesivo entre el momento de la toma y el procesamiento, se reorganizará el transporte de muestras o se corregirá la rutina de trabajo del laboratorio según corresponda.

- Si se repite la contaminación en muestras del mismo paciente, se procederá a utilizar técnicas más enérgicas de decontaminación para investigar muestras sucesivas de ese individuo.
- Si se repite contaminación de muestras derivadas por un mismo servicio, se procederá a coordinar los envíos más oportunos y en condiciones apropiadas.
- Se verificará la esterilidad de los reactivos y el proceso de decontaminación y se harán las correcciones técnicas en caso de detectarse de acuerdo a la normativa vigente.
- Se reentrenará al técnico o profesional que haya procesado las muestras contaminadas en caso en que se detecte que el problema se asocia a un operador.
- Incremento inusual del número o frecuencia de cultivos positivos en un corto periodo de tiempo.
- Se debe investigar la posibilidad de que haya existido contaminación cruzada y por lo tanto falsos resultados positivos de cultivos.

Documento Derogado

- Verificar que los pacientes involucrados no tienen clínica compatible con Tb.
- Que no se repita el aislamiento a partir de otra muestra de estos pacientes.
- Investigar cuando una o varias muestras resultaron con un cultivo con escasas colonias y fueron procesadas inmediatamente después de una muestra con alta carga de bacilos (baciloscopía positiva).
- Estos hallazgos sustentan la sospecha de que existió transferencia de bacilos de la muestra con alta carga bacilar a las otras que resultaron con escaso número de colonias. Si, además, se constata que resultaron positivos sólo los cultivos de muestras que han sido decontaminadas, se sospecha que la transferencia fue realizada mediante las soluciones o instrumentos utilizados durante el proceso de decontaminación.
- Dependiendo de la carga de trabajo y de la incidencia de casos con bacteriología positiva, el análisis mensual, trimestral o semestral del registro del laboratorio permite detectar errores sistemáticos y sostenidos en el tiempo.
- Resulta de interés para controlar la calidad del cultivo, clasificar a los pacientes adultos que se hayan diagnosticado con Tb pulmonar confirmada bacteriológicamente, en alguna de las siguientes categorías:

  a. Baciloscopía (+) y cultivo (+)

  b. Baciloscopía (+) y cultivo no realizado

  c. Baciloscopía (-) y cultivo (+)

  d. Baciloscopía (+) y cultivo (-)

  e. Baciloscopía (+) y cultivo contaminado

  f. Baciloscopía no realizada y cultivo (+)

- Con el total de casos clasificados en cada una de estas categorías, se podrán calcular los siguientes indicadores: C X 100 / a+b+c+d.
- El cultivo es más sensible que la baciloscopía, se espera que su aporte al diagnóstico de las formas pulmonares del adulto sea por lo menos de un 20% de los casos con confirmación bacteriológica.
- Relación entre resultados de baciloscopías y cultivos.

Documento Derogado

- Las muestras investigadas para diagnóstico con resultado de baciloscopía positivo deben tener normalmente resultado de cultivo positivo. El grado de positividad del cultivo (en escala de cruces) debe normalmente ser igual o mayor al de la baciloscopía (también en escala de cruces). Más de un 3%, de muestras cuyo resultado de cultivo tenga un grado de positividad menor al de la baciloscopía es motivo de investigación.
- Analizando el resultado de las muestras de esputo investigadas para diagnóstico se puede calcular.
- Porcentaje de muestras baciloscopía (+) cultivo (-) = D X 100/ a+b+c+d
- Esta proporción debería ser muy baja; alrededor del 2- 3% , de lo contrario investigar fallas técnicas.
- Contaminación.
- Expresada como porcentaje de tubos contaminados sobre el total de tubos sembrados, no debe superar el 3- 5 % si se utiliza el método de Petroff en la tabla 1:

Tabla No. 1 Método de Petroff

Método Petroff	Valor normal (%)	Señales de alarma	
		Si es mucho mayor investigar	Si es mucho menor investigar
Aporte del cultivo al diagnóstico bacteriológico. de tuberculosis.	20	A	B y C
Porcentaje muestras B+C-	2-3	C y D	No hay problema
Porcentaje de cultivos con positividad menor a la de la baciloscopía.	3	C y E	No hay problema
Porcentaje de tubos	3-4	F	G
a Errores de lectura de baciloscopías: “falsos negativos”. A Se está investigando un alto porcentaje de casos de tuberculosis pulmonar poco avanzada, incluyendo pediátricos (no indica problema técnico de laboratorio).			
B Deficiente solicitud de cultivos (se están investigando pacientes que no son SR)			

Documento Derogado

•	Excesiva demora entre la toma y procesamiento de las muestras decontaminación muy enérgica de las muestras (excesiva concentración y/o tiempo de contacto con el decontaminante). Baja velocidad o sobrecalentamiento en la centrífuga
•	Errores de lectura de baciloscopías: “falsos positivos”
•	Tendencia a asignar a la baciloscopía una positividad mayor a la real
•	Muestras conservadas sin refrigeración Demora entre la toma y procesamiento de las muestras Concentración de decontaminante más baja que lo normalizado Escaso tiempo de contacto de la muestra con el decontaminante; Defectos en el proceso de esterilización
f G	Concentración de decontaminante más alta que lo normalizado Excesivo tiempo de exposición de la muestra con el decontaminante Concentración de verde de malaquita en el medio más alta que lo normalizado

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, 2012

Documento Derogado

Análisis de la demora en la entrega de informes.

Más del 95% de los resultados deben haber sido entregados dentro de los sesenta y tres días de tomada la muestra. Verificar que un porcentaje similar de los cultivos positivos hayan sido informados dentro de las cuarenta y ocho horas de detectado el desarrollo. Es necesario confirmar que los resultados hayan sido recibidos por el encargado del Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias en el establecimiento respectivo.

- En caso contrario, identificar la(s) etapa(s) en la(s) que se produce(n) la demora: lectura de cultivos, registro de resultados, escritura del informe, entrega del resultado. Reorganizar consecuentemente la actividad.

Control de calidad externo.

En países con una red de laboratorios establecida y organizada en la que algunos laboratorios de nivel intermedio también realizan cultivo, el LNR centraliza el control de calidad de los medios elaborados en esa red y analiza el aporte del cultivo al diagnóstico de Tb.

El personal de laboratorio debe asegurar la calidad de los registros de:

- Ingreso y procesamiento de muestras y de derivaciones al laboratorio de referencia
- Resultados bacteriológicos
- Resultados de evaluación de la calidad medios de cultivo y reactivos
- Temperatura de los equipos
- Mediante el análisis de la información registrada, es necesario evaluar
- La organización y agilidad del trabajo
- Resultados falso positivos o negativos, contaminación
- Rendimiento del cultivo para el diagnóstico de casos de tuberculosis
- Precisión, claridad y agilidad para el informe de resultado.

XIII. DISPOSICIONES GENERALES

A. Sanciones por el incumplimiento.

Todo incumplimiento a los presentes Lineamientos técnicos, será sancionado de acuerdo a lo prescrito en la normativa administrativa pertinente.

B. De lo no previsto.

Lo que no esté previsto en los presentes Lineamientos técnicos, se debe resolver a petición de parte, por medio de escrito dirigido al Titular de la Cartera de Estado, fundamentando la razón de lo no previsto técnica y jurídicamente.

C. Anexos.

Forman parte de los presentes Lineamientos técnicos, los anexos siguientes:

Anexo 1: Cuadro comparativo entre Métodos de procesamiento de Cultivo BAAR.

Anexo 2: Entrenamiento del Personal que procesa muestras para Cultivo BAAR.

Anexo 3: Actividades Previas a la Muestra.

Anexo 4: Método de Petroff.

Anexo 5: Procesamiento del Cultivo.

Anexo 6: Método de Ogawa-Kudoh.

Anexo 7: Hoja de referencia de cepas de tuberculosis.

Anexo 8: Cultivo de Löwenstein- Jensen.

Anexo 9: Pasos para el ordenamiento de las muestras y material a utilizar.

Anexo 10: Control de Calidad y Consumo de Medios de Cultivo.

Documento Derogado

Anexo 11: Flujograma para el informe de resultados de Cultivo BAAR.

Anexo 12: Registro de Resultados.

Documento Derogado

D. VIGENCIA

Los presentes Lineamientos técnicos entrarán en vigencia a partir de la fecha de su oficialización por parte de la Titular.

San Salvador, a los veintiocho días del mes de abril de dos mil catorce.

María Isabel Rodríguez
Ministra de Salud

Documento Derogado

XIV. ANEXOS

Documento Derogado

Ministerio de Salud

Dirección de Regulación y Legislación en Salud

Programa Nacional de Enfermedades Respiratorias

y Tuberculosis

Anexo 1

Cuadro comparativo entre métodos de procesamiento de Cultivo BAAR

Método de decontaminación	Medio(s) de cultivo necesarios		Requerimientos	
			Equipamiento centrifuga y cabina de seguridad biológica	Presupuesto
Ogawa-Kudoh NaOh 4%	A base de huevos, acidificados (Ogawa)	Pueden ser preparados en el laboratorio a partir de una fórmula simple No dependientes de insumos o equipos de una marca determinada	---------- B	Bajo
Petroff NaOH 3.5% HCL 1N	A base de huevos, neutros (Löwenstein-Jensen)		Adecuado y con buen funcionamiento verificado B	Bajo-intermedio

* Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 2 Cultivo, OPS 2008.

Documento Derogado

Ministerio de Salud

Dirección de Regulación y Legislación en Salud

Programa Nacional de Enfermedades Respiratorias

y Tuberculosis

Anexo 2

Entrenamiento del Personal que procesa muestras para Cultivo BAAR

El personal que procese muestras debe estar entrenado en:

Procedimiento:
• Riesgos, forma de transmisión de la tuberculosis • Higiene • Uso de ropa de protección • Manejo de material (potencialmente) infeccioso • Operaciones para evitar la formación de aerosoles • Organización del laboratorio, flujo de material y del aire • Operaciones a realizar en el caso de accidentes • Operación y mantenimiento de los equipos de laboratorio • Buenas prácticas de laboratorio • Operaciones en esterilidad • Importancia de los resultados para el manejo de casos • Importancia de los resultados para el Programa de control de tuberculosis

Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 2 Cultivo, OPS 2008.

Documento Derogado

Ministerio de Salud

Dirección de Regulación y Legislación en Salud

Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Anexo 3

Actividades Previas a la muestra

Muestra	**Actividades**
Muestras que contienen flora normal	
Esputo	Decontaminación/homogenización
Hisopados	Desprendimiento del material en agua destilada, decontaminación, método de Kudoh, cuando es posible)
Contenido gástrico, orina, sangre menstrual	Centrifugación si el volumen total es mayor a 4 ml, decontaminación
Biopsia de intestino	Desintegración en mortero, decontaminación
Muestras normalmente estériles, tomadas asépticamente.	
Líquidos tomados por punción pleural, cefalorraquídeo, médula ósea, líquido pericárdico, liquido sinovial, articular, pus ,sangre	Centrifugación si el volumen total es mayor a un mililitro.
Biopsia de tejido pleural, ganglionar, cerebral, óseo, entre otros.	Desintegración en mortero.

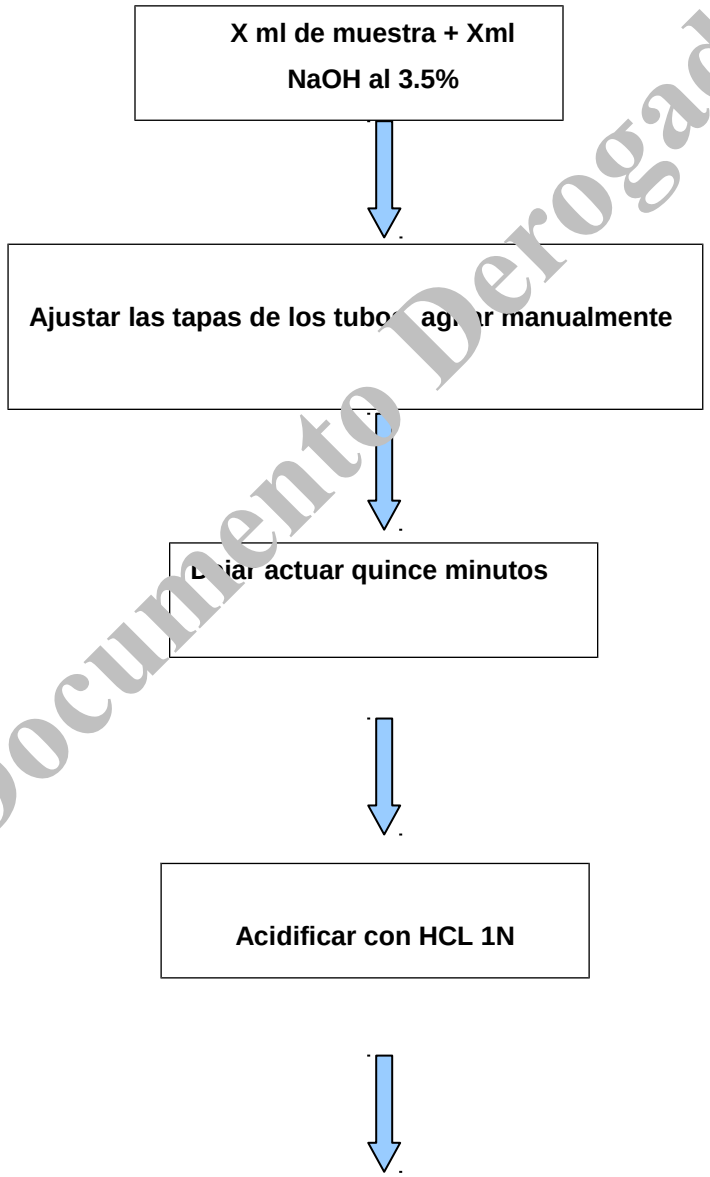
Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis: Cultivo, OPS, año 2008.

*Cuando no se está seguro de la asepsia, se puede dividir la muestra en dos partes iguales. Decontaminar y sembrar una parte el día en que se recibe. Verificar al día siguiente si se contaminó el medio de cultivo. Si no se contaminó, sembrar directamente la segunda parte. Si se contaminó, decontaminar y sembrar la segunda parte. Alternativamente, se puede sembrar una mitad de la muestra directamente y la otra decontaminada, simultáneamente en el día en que se recibe. fuente(la misma del cuadro).

Documento Derogado

Ministerio de salud
Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis
y Enfermedades Respiratorias
Anexo 4

Flujograma del Método de Petroff



Documento Derogado

Neutralizar con NaOH al 2%

↓

Acomodar los tubos en la centrifuga
+ centrifugar quince min a 3000 gravedad a 25-35°

↓

Dejar reposar cinco minutos + controlar que el tiempo total con el NaOH al 3.5% no debe sobrepasar los treinta min

↓

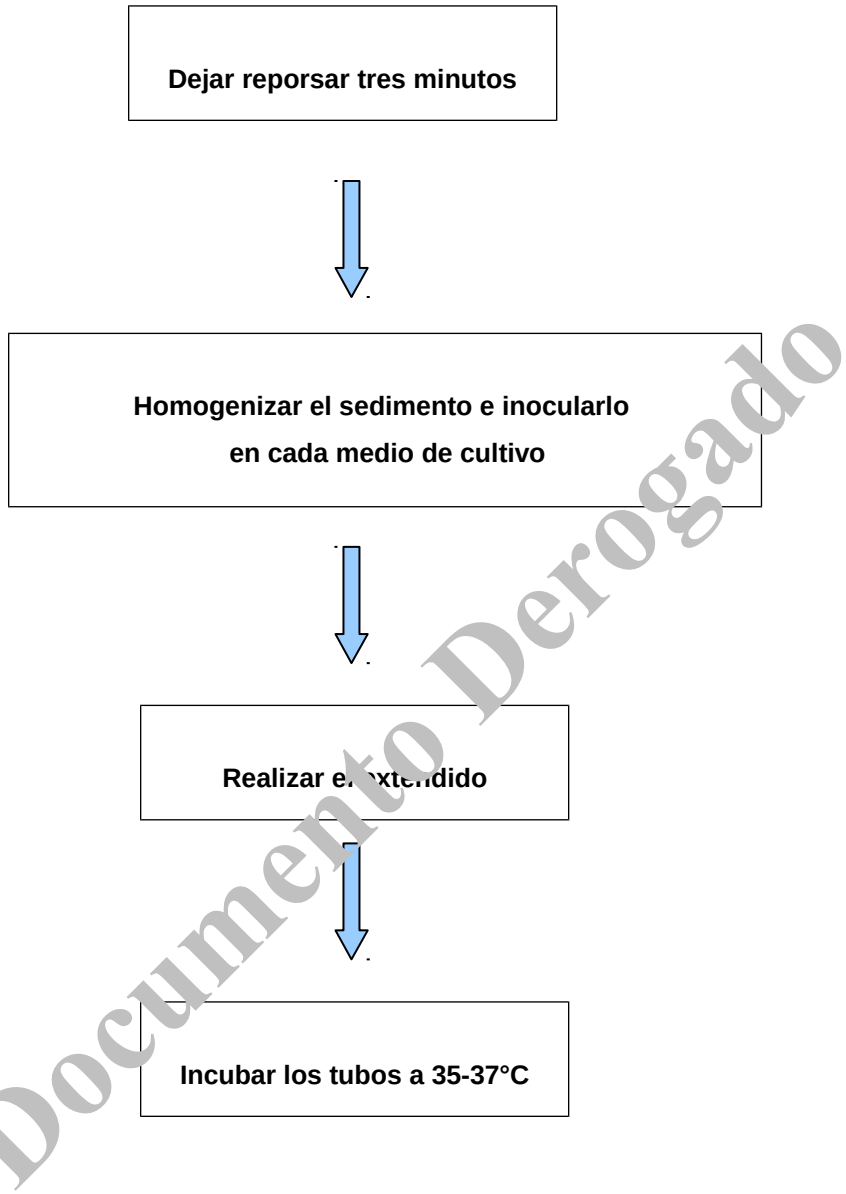
Descartar el sobrenadante

↓

Agregar de 4 a 5 gotas de agua destilada estéril

↓

Documento Derogado



Documento Derogado

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, 2012.

Ministerio de Salud
Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Anexo 5
Procesamiento del Cultivo

Documento Derogado

Ministerio de Salud
Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Anexo 6

Método de Ogawa-Kudoh

Adherir a un hisopo estéril las partículas útiles del esputo

↓

Sumergir en un tubo con 3 ml de NaOH 4% durante 2 minutos

↓

Inocular con el hisopo en un tubo con medio de Ogawa acidificado

↓

Repetir este procedimiento en un segundo tubo

↓

Incubar de 35 a 37 °C

Documento Derogado

Ministerio de Salud

Dirección de Regulación y Legislación en Salud

Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Anexo 7

HOJA DE REFERENCIA DE CEPAS DE TUBERCULOSIS

ESTABLECIMIENTO QUE ENVIA: _____

FECHA DE ENVIO: _____ No. DE MUESTRA: _____

CULTIVO DE: DIAGNOSTICO ( ) FRACASO ( ) ABANDONO RECUPERADO ( )

RECAIDA ( ) CENTRO PENAL ( ) TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR ( )

NO NEG AL 2º MES DE TRATAMIENTO ( ) NO NEG. AL 3º MES DE TRATAMIENTO( )

NOMBRE: _____ No REGISTRO: _____

EDAD: _____ SEXO: _____ VIH: _____

TIPO DE MUESTRA: _____ FECHA DE SIEMBRA: _____

FECHA DE CRECIMIENTO: _____

RESULTADO DE BACILOSCOPIA DE LA MUESTRA: _____

RESPONSABLE: _____

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, 2012.

Documento Derogado

Ministerio de Salud
Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Anexo No. 8

Cultivo de Lôwenstein-Jensen

1 2 3 4

1. Micobacteria ambiental cromógena.
2 .Micobacteria ambiental de rápido desarrollo.
3. Micobacteria ambiental de lento desarrollo.
4. Myocobacterium tuberculosis.

Documento Derogado

Ministerio de Salud

Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Anexo 9

Pasos para el ordenamiento de las muestras y el material a utilizar:

- Lavarse las manos. Colocarse guantes desechables
- Ordenar todas las muestras que serán cultivadas según su número.
- Numerar para cada muestra un tubo estéril. Puede ser necesario más de un tubo en el caso de orinas y contenidos gástricos.
- Por cada muestra, numerar dos tubos con cada medio de cultivo a utilizar.
- Ubicar en cada columna de la gradilla el material correspondiente a una muestra, delante el tubo de la muestra y detrás los tubos con medio de cultivo. Ordenar el material correspondiente de izquierda a derecha, según la numeración correlativa.
- Preparar y numerar un portaobjetos para realizar una baciloscopía por muestra. Ordenar los portaobjetos según su numeración y mantenerlos separados uno del otro al menos por un cm. de distancia durante todo el proceso, incluso durante la tinción.
- Ubicar dentro de la cabina de seguridad todo el material necesario. Conviene tener una lista escrita de este material para no olvidar ningún elemento.
- Los envases con las muestras ordenados según su numeración.
- La(s) gradilla(s) conteniendo los tubos para la muestra y los medios de cultivo ordenados.
- Los portaobjetos para la baciloscopía ordenados.
- Una gradilla conteniendo los tubos con el decontaminante y reactivos para la neutralización.
- Un mortero estéril, un tubo con tapa de rosca conteniendo arena estéril.
- Una pinza estéril para cada muestra de tejido e hisopado recibido.

Documento Derogado

- Goteros estériles con su bulbo para dispensar el decontaminante.
- Pipetas estériles de 5 a 10 ml.
- Uno o dos recipientes de polipropileno y/o acero inoxidable, autoclavables, conteniendo hipoclorito 0.5 % , con capacidad suficiente para contener el descarte del material contaminado durante la rutina de trabajo.
- Algodón, un frasco lavador con hipoclorito 1% para limpiar bocas o paredes de los tubos en caso necesario y otro frasco lavador con fenol 5% para limpiar eventuales derrames o salpicaduras de mayor magnitud.
- Una bolsa desechable y autoclavable, con capacidad suficiente para descartar los tubos de centrífuga de plástico que se utilizan en un día de trabajo.
- Ubicar cerca de la cabina un recipiente de polipropileno o acero inoxidable con tapa, para el autoclavado del material que será desechado, el cual debe tener capacidad suficiente para dos condiciones: 1) Contener los tubos de centrifuga que se descarten dentro de la bolsa, papeles y algodón que eventualmente fueran utilizados y 2) El recipiente con sobrenadantes herméticamente cerrado, pinzas, morteros, y elementos accidentalmente salpicados con material potencialmente patógeno.
- Mantener al lado de la centrifuga tubos del mismo tipo de los utilizados para procesar las muestras, en un número igual a la mitad de los portatubos que tiene el rotor en uso, y un frasco dispensador con agua destilada o etanol 70° para equilibrar los tubos impares.
- Debe contarse con bandejas de acero inoxidable que permitan inclinar los tubos sembrados.
- Ubicar cerca del mechero y del lavabo todos los elementos necesarios para la fijación y tinción de los frotis.
- Todos los procedimientos que siguen hasta finalizar la siembra de las muestras, deben ser realizados con las siguientes precauciones:
- Observar lo descrito en el apartado de bioseguridad del presente Lineamiento Técnico, Manual de procedimientos de bioseguridad para los laboratorios clínicos y en el Manual de procedimientos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis por microscopia directa.
- Encender la cabina de seguridad biológica, permitir que se establezca el flujo laminar de aire y evitar alterarlo.

Documento Derogado

Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Anexo No. 10
Control de Calidad y Consumo de Medios de Cultivo

No de Lote	Tubos Preparados	pH	Fecha			Control de Esterilidad	Control de Sensibilidad				
			Elaboración o recepción	Se comenzó a utilizar	Se acabó	Se detectó desarrollo	cepa/muestra sembrada	Desarrollo 20 días (colonias)		Desarrollo en 60 días (colonias)	
								Lote referente	Lote preparado	Lote referente	Lote preparado

Documento Derogado

Ministerio de Salud
Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Anexo 11

Flujograma para la Información de Resultados de Cultivo BAAR

Selección de cultivos (+) para su identificación y prueba de sensibilidad por laboratorio a nivel local

↓

Referencia a LNR si a nivel local no se realizó la prueba de sensibilidad

↓

Enviar a LNR los aislamientos obtenidos y verificar si pertenecen a un mismo microorganismo

↓

Documento Derogado

Transcribir los resultados en la PCT-3

Informar los resultados negativos, al finalizar la 8va Sem. de incubación en los medios a base de huevo

Documento Derogado

Ministerio de Salud
Dirección de Regulación y Legislación en Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

ANEXO 12

REGISTRO DE RESULTADOS.

Documento Derogado

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)

XV. Bibliografia

1. María Delfina Sequeira, OPS/OMS, Manual para el diagnóstico bacteriológico de la Tuberculosis, Parte II, año 2008.

2. Dr. Alonso Soto Tarazona, Editor Científico Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, Medios de Cultivo para el Diagnóstico de la Tuberculosis: “Una Perspectiva de los Países en Vías de Desarrollo”, año 2008.

3. Victorino Farga y José Antonio Caminero , Tuberculosis, Editorial Mediterraneo, Santiago y Buenos Aires, Tercera Edición, 1992.

4. Norma Técnica para la prevención y control de la Tuberculosis, Ministerio de Salud, Programa Nacional de Enfermedades Respiratorias y Tuberculosis, año 2012.

5. Manual de Toma, Manejo y Envío de Muestras, Ministerio de Salud, Programa Nacional de Tuberculosis, Enero 2006.

Documento Derogado