GOBIERNO DE
EL SALVADOR

MINISTERIO
DE SALUD

Documento Derogado

Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico

El Salvador, 2019

GOBIERNO DE
EL SALVADOR

MINISTERIO
DE SALUD

Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico

El Salvador, 2019

Documento Derogado

2019 Ministerio de Salud

Atribución-NoComercial-SinDerivadas
4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0)

Está permitida la reproducción parcial o total de esta obra por cualquier medio o formato, siempre que se cite la fuente y que no sea para la venta u otro fin de carácter comercial. Debe dar crédito de manera adecuada. Puede hacerlo en cualquier formato razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen apoyo de la licencia.
La documentación oficial del Ministerio de Salud, puede Consultarse en el Centro de Documentación Virtual en: http://asp.salud.gob.sv/regulacion/default.asp

Edición
(nombre de editor)

Ilustraciones o imágenes
(nombre del autor o autores)

Impresión
(solo si se imprime)

Ministerio de Salud
Calle Arce No. 827, San Salvador. Teléfono: 2591 7000
Página oficial: http://www.salud.gob.sv

Documento Derogado

Autoridades

Dra. Ana del Carmen Orellana Bendek
Ministra de Salud

Dr. Carlos Gabriel Alvarenga Cardoza
Viceministro de Gestión y Desarrollo

Dr. Francisco José Alabí Montoya
Viceministro de Operaciones en Salud

Documento Derogado

Equipo técnico

Nombre	Dependencia
Dr. Julio Garay Ramos Lic. René Guevara	Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Licda. Yanira Emperatriz Meléndez Cortés Lic. José Nelson Linares Rosales	Laboratorio Nacional de Referencia
M.Cs. Luis Francisco López Guzmán Lic. Ernesto Villalobos Ayala	Dirección de Regulación y Legislación Sanitaria

Comité consultivo

Nombre	Cargo
Licda. Patricia Trejo Valencia	Colaborador técnico regional, laboratorio clínico. Región Central de Salud
Lic. Manuel Enrique García Sandoval	Profesional de laboratorio clínico, Región Metropolitana de Salud
Licda. Yanira Emperatriz Meléndez Cortés	Encargada Sección de tuberculosis, LNR
Licda. Deisy Vilma Cañas	Jefe de Laboratorio UCSF Periférica San Vicente
Lic. Joel Alcides Flores Beltrán	Profesional en laboratorio clínico,
Licda. Norma Yesenia Hércules de Vásquez	Profesional en laboratorio clínico, Hospital Nacional San Bartolo
Licda. Zenia Yamileth Cruz Hernández	Profesional en laboratorio clínico, Hospital Nacional San Rafael
Licda. Patricia Beatriz Marroquín García	Técnico de Laboratorio Clínico, Hospital General, ISSS
Licda. Yessica Georgina Tejada de Alfaro	Licenciada en laboratorio clínico, Dirección General de Centros Penales
Licda. Sonia Jeannette Henríquez de Rivas	Técnico de Laboratorio Clínico, Unidad Médica Apopa, ISSS.
Licda. Ena Elizabeth Alfaro de Ochoa	Colaborador técnico laboratorio. Región Occidental
Licda. Herminia Vásquez	Colaborador técnico laboratorio. Región Paracentral
Lic. José Ricardo Hernández Franco	Profesional de laboratorio clínico, Hospital Nacional de San Miguel

Documento Derogado

Licda. Patricia Leonor Marroquín Rodas	Técnico de Laboratorio Clínico, Hospital General, ISSS.
Licda. Rosa Elena Valladares de Carranza	Jefe de sección, Unidad Médica Atlacatl. ISSS
Licda. Marisol García	Jefe de laboratorio clínico, UCSF, Zacamil
Licda. Eda Carolina Díaz Rodríguez	Licenciada en laboratorio clínico, Hospital Nacional de Santa Ana
Licda. Obelinda Cerritos Pineda	Licenciada en laboratorio clínico, Hospital Nacional de Chalatenango
Licda. Lucía Jeannette Rodríguez de Castro	Licenciada en laboratorio clínico, Hospital Nacional de San Vicente.
Licda. Rosaura Sánchez Estrada	Coordinadora área de tuberculosis, Hospital Nacional Rosales
Licda. María de los Ángeles López Salazar	Licenciada en laboratorio clínico, Dirección General de Centros Penales
Licda. Susana Blanco	Colaborador Técnico, División de Vigilancia Sanitaria, ISSS

Equipo técnico participante en la validación de los lineamientos

Nombre	Cargo
Licda. Yaneth Marlene Alveño de Varela	UCSF, San Pablo Tacachico
Licda. Xiomara Sulema Benitez Benitez	Hospital Nacional Santa Rosa de Lima
Licda. Hilda Marina Tenas Caledonio de Castro	UCSF-E Sesori
Lic. Manuel de Jesús Miranda	UCSF Lourdes, San Salvador
Licda. Norma Álvarez de Álvarez	UCSF-I Armenia
Licda. Felícita López de Torres	Hospital Nacional Zacamil
Licda. María Josefa Zelaya Díaz	Hospital Nacional de Nueva Concepción
Licda. Gloria Beatriz Guardado Bojorquez	Hospital Nacional Sonsonate
Licda. Margaritha Ivonne Sánchez de Zepeda	UCSF-E La Libertad
Licda. Alba Argelia Alfaro	Consultorio de especialidades ISSS
Lic. René Alejandro Hernández Cruz	Hospital Nacional Santa Teresa
Licda. Ana Gloria Martínez de Cerna	UCSF-I Santiago Nonualco
Licda. Regina Elizabeth Hernández Callejas	UCSF-I Ahuachapán
Licda. Heidi Lorena Batres de Portillo	Hospital Nacional San Pedro, Usulután
Lic. Romeo Alexander Cañas Andrade	UCSF Ciudad Barrios

Documento Derogado

Lic. David Alexander Rivera Ayala	Hospital Nacional de Nueva Concepción
Lic. Leyla Carina López Monje	Hospital Nacional de Soyapango
Licda. Yanira Aracely Dubón Castro	UCSF Barrios
Licda. Sandra Amelia Platero de Morales	Hospital Nacional de Chalatenango
Licda. Ana Mirtala Velásquez Hernández	UCSF Ciudad Arce
Licda. Alicia Rodríguez Cañas	Hospital Nacional Jiquilisco
Licda. Keny Ámbar Cubías de Hernández	UCSF-I Taquillo
Licda. Blanca Mirian Pérez Ramos	Hospital Nacional San Vicente
Técnica Silvia Elena Vargas Álvarez	Hospital Nacional San Juan de Dios. Santa Ana
Licda. Patricia Orellana de Figueroa	Coordinadora Red nacional de laboratorio clínico
Licda. Mirian Elena Cuéllar de Vanegas	Hospital Nacional Francisco Meléndez, Ahuachapán
Licda. Delmy Sulimar Jirón Ramos	UCSF-E Dr. Roberto Cáceres Bustamante. San Marcos
Licda. Ana Patricia Elena Guzmán Beltrán	Hospital Nacional San Rafael
Lic. Juan Carlos Linares Ibarra	UCSF-I Coatepeque
Licda. Norma Iris Pérez de Rodríguez	Sección de tuberculosis. LNR
Licda. Johanna Vanessa Acuña Durán	Sección de tuberculosis. LNR
Lic. Francisco Alberto Gutiérrez Blanco	Sección de tuberculosis. LNR

Documento Derogado

Índice

I. Introducción 9

II. Objetivos 10

III. Base legal 10

IV. Ámbito de aplicación 11

V. Contenido técnico: 11

Recolección de muestras

Recepción, conservación y transporte de las muestras 19

Métodos de diagnóstico para la tuberculosis 23

Baciloscopía 23

Cultivo 40

Prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico 63

Adenosin deaminasa 72

Bioseguridad 80

Supervisión y control de calidad 88

Sistema de registro 106

VI. Disposiciones generales 107

VII. Vigencia 109

VIII. Abreviaturas y siglas 110

IX. Bibliografía 111

X. Anexos 114

Documento Derogado

I. Introducción

El Ministerio de Salud, implementa la actualización de documentos regulatorios que permitan potenciar el trabajo y estandarizar las técnicas que el personal de salud desarrolla con el fin de mejorar la calidad del servicio brindado a la población.

El trabajo desarrollado en los laboratorios es importante no solo por su rol en el diagnóstico de las enfermedades transmisibles como la tuberculosis, sino también en el control de la evolución del tratamiento de los pacientes, así como la evaluación epidemiológica y operacional. Tiene como función principal, la detección de fuentes de infección tuberculosa a través de métodos como la baciloscopía (una técnica básica, sencilla, eficaz y de bajo costo), el cultivo, prueba molecular y prueba bioquímica como la Adenosin deaminasa, que debe ser empleada preferentemente como apoyo al diagnóstico de tuberculosis extra-pulmonar.

La elección de la técnica más conveniente y su estandarización permite la obtención de resultados comparables a lo largo de todo el país, además de facilitar la capacitación así como la ampliación de la cobertura.

El propósito de los presentes lineamientos, es proporcionar al personal de laboratorio clínico del Sistema Nacional de Salud (SNS) y de otras instituciones prestadoras de servicios de salud, información sobre los procedimientos técnicos aplicables para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis.

Documento Derogado

II. Objetivos

Objetivo general

Establecer los criterios estandarizados para la realización de las diferentes pruebas de laboratorio clínico, a fin de contribuir al diagnóstico, control y tratamiento oportuno de la tuberculosis.

Objetivos específicos

1. Proporcionar al personal de laboratorio clínico los criterios técnicos administrativos que establezcan los procedimientos para la realización de las pruebas con estándares de calidad.
2. Estandarizar el informe de análisis de las pruebas y su notificación oportuna en los diferentes sistemas de información en los niveles correspondientes.
3. Fortalecer el cumplimiento de la normativa vigente de bioseguridad en el manejo y proceso de las muestras como medidas de control de infecciones para la protección del personal de salud y del medio ambiente.

III. Base legal

Código de Salud:

Art. 40.- El Ministerio de Salud es el organismo encargado de determinar, planificar y ejecutar la política nacional en materia de salud, dictar las normas pertinentes, organizar, coordinar y evaluar la ejecución de las actividades relacionadas con la salud.

Art. 41.- Corresponde al ministerio:

Numeral 4. «Organizar, reglamentar y coordinar el funcionamiento y las atribuciones de todos los servicios técnicos y administrativos de sus dependencias».

Art. 149.- 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 y el adecuado tratamiento; control y rehabilitación de los enfermos. Estas normas y acciones serán obligatorias en todos los establecimientos de salud públicos y privados.

Reglamento Interno del Órgano Ejecutivo

Art. 42.- «Dictar las Normas y técnicas en materia de salud y ordenar las medidas y disposiciones que sean necesarias para resguardar la salud de la población»

Documento Derogado

IV. Ámbito de aplicación

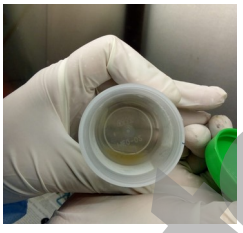
Están sujetos al cumplimiento de los presentes Lineamientos técnicos, el personal del Sistema Nacional de Salud, incluyendo el Instituto Salvadoreño del Seguro Social, los establecimientos de salud públicos y otras instituciones proveedoras de salud, entre ellas centros penales.

V. Contenido técnico

Recolección de muestras

Para establecer un buen diagnóstico de tuberculosis, se requiere una adecuada recolección de la muestra clínica en relación a calidad y cantidad, recolectada en el envase recomendado, correctamente identificado; conservada en las condiciones requeridas y transportada al laboratorio en el tiempo oportuno, con el objetivo de asegurar la confiabilidad de resultados.

Muestra saliva **Mucosa** **Mucopurulenta**



Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (PNTYER)/ Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNSP)

Esputo

Es la muestra ideal para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar.

El envase debe cumplir las siguientes características:

- Plástico transparente: que permita observar el volumen y la calidad de la muestra sin abrir el envase; para prevenir accidentes y facilitar su adecuado descarte.
- Libre de partículas de polvo u otros contaminantes. No necesariamente estéril.
- Boca ancha: 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 treinta y cinco a cincuenta milímetros de diámetro para que el paciente pueda depositar el esputo con facilidad dentro del envase, sin ensuciar sus manos o las paredes del frasco.

Documento Derogado

- Fácil de rotular: lo que permitirá una identificación indeleble o la colocación de una viñeta.

Recolección de la muestra

El personal de salud que da indicaciones para la recolección de la muestra, debe rotular el frasco con la siguiente información: nombre completo del paciente, número de identificación correspondiente del paciente (expediente, ficha familiar, afiliación dependiendo de la institución o establecimiento de procedencia), tipo de muestra (esputo, aspirado gástrico, etc), numero de muestra.

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (PNTYER)

Para diagnóstico dos muestras por sintomático respiratorio.

La primera muestra tomada en el momento de la consulta, en el momento que se identifica al sintomático respiratorio. La segunda la debe recolectar el paciente en su casa, por la mañana al despertar (muestra matinal). Es más probable que se eliminen bacilos en las muestras matinales.

Para control de tratamiento dos muestras recolectadas por la mañana, en días consecutivos (ver Norma técnica para la prevención y control de la tuberculosis)

Para obtener una muestra de esputo de calidad, debe proporcionar las indicaciones al paciente:

Para obtener una muestra de esputo de calidad, debe impartir consejería al paciente dándole a conocer lo siguiente:

1. Recolectarla en un área con ventilación (preferentemente al aire libre) y no en lugares encerrados como el baño. En el caso de pacientes hospitalizados, en la medida de lo posible se deben desplazar a un lugar ventilado.
2. Evitar el uso de lápiz labial al momento de recolectar la muestra.
3. Enjuagarse la boca con agua antes de dar la muestra, con el objetivo de eliminar restos alimenticios.
4. Sonarse la nariz antes de obtener la muestra para evitar que la secreción nasal sea proporcionada como flema.
5. El paciente debe inspirar profunda y lentamente, luego retener por un instante el aire en los pulmones, y después debe toser con fuerza y expectorar dentro del frasco que tiene listo en la mano, repetir este proceso hasta obtener suficiente muestra (5 mililitros).
6. Cerrar bien el frasco procurando que el esputo no contamine el exterior del mismo.
7. Entregarlo al personal de salud.

Documento Derogado

Aspirado y lavado gástrico

- Número de muestras: Se debe de considerar que los pacientes infantiles presentan lesiones que contienen escasos bacilos y por lo tanto es poco probable detectarlos, de ahí la recomendación de 3 muestras en días consecutivos o sea uno por día y el paciente debe de estar hospitalizado, ya que el procedimiento para el aspirado y/o lavado gástrico se realiza antes de que el paciente despierte y que haya ingerido alimentos.
- Se emplea especialmente en diagnóstico de tuberculosis infantil y en casos especiales en adultos.
- Se recomienda utilizar esta muestra sólo para diagnóstico y no para control de tratamiento.
- Utilizar el envase con las especificaciones descritas anteriormente.
- Se debe ingresar al paciente un día antes y tomar la muestra a las cinco horas de la mañana, en ayunas antes de que despierte el paciente; 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).
- La muestra debe ser tomada por personal médico y en previa coordinación con el personal de laboratorio.
- La baciloscopía tiene valor relativo, en pacientes infantiles ya que presentan lesiones que contienen escasos bacilos y por lo tanto es poco probable detectarlos y es posible que la muestra contenga micobacterias ambientales que pueden inducir a resultados falsos positivos.

Procedimiento

Aspirado gástrico: para estudio bacteriológico. (Ver apartado procedimiento para aspirado gástrico de la *Guía clínica para la atención pediátrica de la tuberculosis y la coinfección TB-VIH)*

a. Se debe ingresar al paciente un día antes del procedimiento
b. Introducir una sonda nasogástrica (longitud y diámetro adecuado a la edad del paciente hasta el estómago), la noche del ingreso.
c. Fijar y marcar el punto de fijación de la sonda.
d. A las cinco horas de la mañana, aspirar el contenido gástrico con jeringa (no debe ser menor de 5 y mayor de 10 mililitros), en ayunas antes de que despierte el paciente; dado que la ingesta de alimentos hace que la expectoración ingerida pase al intestino.
e. Depositar la muestra en el envase con las especificaciones descritas anteriormente.

Documento Derogado

f. Rotular el frasco de acuerdo a lo descrito anteriormente para su envío al laboratorio clínico, donde se procederá a estabilizar la muestra previo procesamiento.
g. Procesar muestra dentro de las cuatro horas siguientes de la recolección.

Si la muestra es menor de 5 mililitros, se debe realizar lavado gástrico.

- Introducir una sonda nasogástrica la noche anterior, fijar y marcar el punto de fijación.
- A las 5:00 am, sin despertar al paciente y en ayunas aspirar el contenido gástrico con jeringa.
- Utilizar el mismo envase aconsejado para muestra de esputo. (En el laboratorio se procede a estabilizar la muestra con bicarbonato). Anexo 1
- La cantidad mínima recuperada debe ser de 5 a 10 mililitros.
- Rotular la muestra como «aspirado gástrico».
- Procesar muestra dentro de las cuatro horas siguientes de la recolección. Si excepcionalmente no es posible el procesamiento inmediato, debe conservarse en refrigeración (2 a 8 °C) por no más de 24 horas

Estabilización de la muestra

Se realiza con bicarbonato de sodio en proporción de un mililitro de bicarbonato al 10% para dos mililitros de aspirado o contenido gástrico.Ver anexo 1.

Procedimiento
Lavado gástrico.

- Introducir a través de la sonda entre 30 y 50 mililitros de agua destilada estéril o solución salina estéril, aspirar muy suavemente con la jeringa para que la succión no provoque daño.
- La cantidad mínima recuperada debe ser de 20 mililitros.
- El material debe ser enviado inmediatamente al laboratorio (en embalaje adecuado, en caso de referencia a otro laboratorio), para que sea centrifugado y cultivado en las cuatro horas siguientes a su obtención.

Otros tipos de muestras

Todas las muestras extrapulmonares deben ser enviadas para cultivo BAAR y eventualmente procesadas a través de prueba molecular como el Xpert MTB/RIF.

Orina para cultivo BAAR

Previa higiene externa, se recomienda que la muestra obtenida sea del segundo chorro de la primera micción de la mañana, utilizando la técnica de medio chorro, desechando la primera

Documento Derogado

parte de la micción (para disminuir la carga de contaminantes); recogiendo el segundo chorro en el frasco (no menos de 50 mililitros) y descartando el resto de misma.

Es importante realizar cultivo debido a la frecuencia con que se encuentran otras micobacterias.

- Número de muestras: mínimo tres y máximo seis, en días consecutivos.
- Frasco con capacidad de cien a ciento veinte mililitros, estéril y boca ancha para facilitar la recolección directa de la muestra, no menor de 50 ml.
- Conservación: la muestra debe ser procesada inmediatamente porque el pH ácido afecta la viabilidad del bacilo. Si se debe transportar hasta otro laboratorio debe enviarse inmediatamente en cadena de frío.

Cuadro 1. Muestras extrapulmonares

Tipo de muestra	Cantidad requerida	Temperatura de almacenamiento	Tipo de recipiente
Líquido cefalorraquídeo	De 1 a 3 mililitros por tubo (todos los que el médico crea conveniente, según las pruebas requeridas)	De 2 a 8 °C. No más de 12 horas. Si la muestra es para Xpert MTB/RIF conservarla de 2 a 8 °C, por un tiempo máximo de 7 días. En el caso de ADA las muestras deben ser almacenadas a menos 20 °C	Tubo estéril con tapa de rosca y cierre hermético, capacidad de 10 - 15 mililitros, sin anticoagulante.
Líquidos: ascítico, pericárdico, articular, médula ósea, pleural, otros.	De 2 a 3 mililitros por tubo (todos los que el médico crea conveniente, según las pruebas requeridas) Uso de anticoagulante: puede extraerse mediante el uso de una jeringa heparinizada o, eventualmente, luego de extraído el líquido en una jeringa, puede colocarse en un recipiente estéril y agregarse dos gotas de citrato de sodio al 10% o de oxalato de potasio al 10% por cada 10 ml de muestra. Cuando la muestra de líquido pleural sea para ADA debe aprovecharse la oportunidad de investigar por BK y cultivo el sedimento de la muestra.	Se debe procesar inmediatamente o almacenarlo de 2 a 8 °C Las muestras para ADA deben ser almacenadas a menos 20 °C	Tubo estéril, tapón hermético de rosca con capacidad de 10 a 15 mililitros.
Biopsias y material resecado	Será tomada por el personal médico, la cantidad que éste considere conveniente.	De 2 a 8 °C. Si es para prueba rápida molecular el máximo tiempo de	Utilizar frasco estéril.

Documento Derogado

	Agregar 1 o 2 mililitros de solución salina o agua destilada estéril o la cantidad requerida según el tamaño de la muestra, para evitar la desecación. No agregar formol para el estudio bacteriológico porque es letal para el bacilo.	conservación antes de su procesamiento es de 7 días.	
Pus	De 1 a 3 mililitros o de 2 a 4 hisopos humedecidos previamente con solución fisiológica o agua destilada estéril.	De 2 a 8 ºC	Utilizar frasco estéril

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Nota: La sangre y las heces no son muestras adecuadas para el diagnóstico de tuberculosis, debido a las metodologías que actualmente son utilizadas por la red.

Recepción, conservación y transporte de las muestras

El personal del laboratorio que recibe las muestras debe:

a. Aplicar las medidas de bioseguridad.
b. Abrir la caja sobre una mesa en el área de recepción de laboratorio o donde procesa la muestra, inspeccionando si se han producido derrames.
c. En caso de confirmar el derrame, retener la muestra, desinfectar el exterior de los envases utilizando algodón humedecido con hipoclorito de sodio al 0.5% y será motivo de rechazo
d. Revisar el llenado completo y correcto del formulario de la solicitud del examen bacteriológico de tuberculosis (PCT-3) (anexo 2), que cumpla con toda la información requerida y con letra legible de acuerdo a lo establecido en los lineamientos técnicos para los laboratorios clínicos vigente.
e. Verificar que los frascos estén herméticamente cerrados y que la información haya sido escrita en el cuerpo y no en la tapa del mismo.
f. Cotejar la información de la viñeta del frasco con la información de la PCT -3
g. Notificar al servicio o establecimiento que envió las muestras, si se han observado inconvenientes de rechazo de muestra, utilizando el formulario de notificación de muestras rechazadas descrito en el POE de recepción de muestras. Las muestras podrán ser rechazadas según los criterios descritos en anexo 3. Motivo de rechazo de muestras
h. El horario de recepción de muestras será de acuerdo al horario del nivel de atención del establecimiento de salud
i. En caso de recibir una muestra directa del paciente, se debe insistir en las instrucciones para la toma de la segunda muestra.

Documento Derogado

Casos especiales

a. Si el laboratorio que recibe las muestras no realiza todas las pruebas solicitadas, deberá enviar la muestra a su laboratorio de referencia en RIIS.

b. Los establecimientos que no tienen laboratorio no deben referir al paciente, se debe enviar las muestras 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 muestra); por lo que el laboratorio clínico, rechazará toda muestra que excede las 72 horas de recolectada.

c. En vacaciones largas, si los establecimientos de Fosalud captan un sintomático respiratorio, deberán coordinar con el laboratorio clínico de segundo nivel de atención de su red, la recepción y procesamiento de la muestra.

Conservación de las muestras:

- Después de recibida la muestra, es necesario agilizar los procedimientos de montaje y lectura.
- Las muestras que serán procesadas para cultivo deben ser conservadas de 2 a 8°C y procesadas entre los primeros 3 días, si no es posible procesar las muestras durante el día deben de ser conservadas en refrigeración hasta un máximo de 7 días.
- Cuanto antes se procese la muestra, mayor será la posibilidad de encontrar en ella el *M. tuberculosis*. La temperatura ambiente y el transcurso del tiempo favorecen la multiplicación de los microorganismos que son causantes de contaminación en los medios inoculados, disparando así los índices de contaminación en los cultivos.

Transporte de las muestras:

- El transporte debe hacerse por lo menos, dos veces por semana, estableciendo los días de la semana en los que se efectuarán regularmente los envíos, el medio de transporte, el horario de salida y de llegada.
- Las muestras que requieren procedimientos especiales como cultivo BAAR, pruebas moleculares, tipificación, deben ser transportadas en cadena de frío y en triple embalaje. (Anexo 4). Triple embalaje para transporte de muestras.

Documento Derogado

- Cada envío debe ser acompañado por las hojas de solicitud de examen correspondiente, fuera del embalaje, con la información requerida y letra legible, especificando si es muestra para diagnóstico o para control de tratamiento en la que se indicará el mes al que corresponde. En el caso de envío de muestras para cultivo BAAR y prueba molecular deben ser acompañadas del libro de registro de envío de cultivo BAAR (PCT-11). (Anexo 5).

Red de laboratorios

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

Los servicios de laboratorio son más eficientes y potentes cuando se integran en una red nacional de laboratorios de tuberculosis que debe involucrar a laboratorios del sistema nacional de salud, incluyendo a los que prestan servicios en centros penitenciarios, a los laboratorios del Seguro Social, laboratorios privados y de organizaciones no gubernamentales.

En El Salvador, al primer semestre del año 2018 existen 214 laboratorios detallados así: 188 del Ministerio de Salud, 19 del Seguro Social, 1 de centro penitenciario y 5 del sector privado que constantemente están participando en la investigación de sintomáticos respiratorios.

La conducción de esta red debe estar integrada en el nivel de programación de decisión del PNTYER, el que a su vez, debe hacer las gestiones necesarias para sostener la organización y el funcionamiento de esta red de apoyo al diagnóstico y control de tratamiento de la tuberculosis.

Métodos para diagnóstico de la tuberculosis

Baciloscopía

Esta técnica se basa en la propiedad que tienen las micobacterias de captar en su pared a la fucsina fenicada (de color fucsia) y retenerla aún con la acción de decolorantes, como la mezcla de ácido y alcohol, propiedad conocida como ácido alcohol resistencia. Esta característica se debe al alto contenido en lípidos, particularmente del ácido micólico, que poseen en la pared celular.

La baciloscopía detecta del 70 al 80% de los casos, por lo que es recomendada en los países con escasos recursos económicos.

Equipos, material y reactivos para procesar baciloscopías.

El personal de laboratorio debe disponer de lo siguiente:

Documento Derogado

Cuadro 2. Equipo, materiales y reactivos para baciloscopías

Equipo:	**Cantidades**
Microscopio binocular.Ver anexo 6	1
Reloj marcador de tiempo	1
Materiales:	
Mechero de alcohol.	1
Bandeja metálica o varilla para coloración con soporte para láminas.	1
Frascos de vidrio ámbar para colorantes de 1,000 mililitros	3
Frascos gotero tapa esmerilada vidrio ámbar de 100 mililitros	3
Gradilla para láminas.	3
Envases plásticos de 35-40 mililitros.	1
Pinza o asa metálica para antorcha.	1
Embudos plásticos.	2
Frascos lavadores de 250 mililitros	3
Caja de baquelita de 100 porta láminas	2
Materiales gastables:	
Aplicadores de madera.	2 por BK
Lámina portaobjeto 3 x 1 pulgada esmerilada.	1 por BK
Plumón indeleble negro o azul.	1 por mes
Caja o pliegos de papel filtro.	2 por mes
Rollos de papel toalla o periódico.	2 por mes
Lapicero azul, negro y rojo.	3 por mes
Libro de registro de actividades de laboratorio, (PCT- 4).	1 al año o según necesidad
Paquete de fósforos.	3
Libreta de papel limpia lentes.	3
Galón de jabón para manos.	3
Algodón (libras)	5
Rollo de gasa de 100 yardas	1
Lápiz grafito.	1 cada dos meses
Equipo de protección personal:	
Respiradores N-95 o N-100 de BFE (filtro de eficiencia de filtración	4 mensual

Documento Derogado

bacteriana)	
Caja de guantes descartables	2 mensual
Gabacha descartables	20 mensual
Gorro	20 mensual
Lentes protectores	3
Reactivos:	
Fucsina fenicada 0.3%, mililitros	5 por BK
Alcohol ácido 3%, mililitros	5 por BK
Azul de metileno 0.1%, mililitros	5 por BK
Lejía comercial al 0.5% o Fenol al 5%, galón	1 mensual
Alcohol 90%, litro	1 mensual
Aceite de inmersión. (Índice de refracción = 1.515-1.517. Viscosidad = 100-120), mililitros	1 gota = 0.05 por BK

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Las cantidades a solicitar de forma trimestral, semestral o anual, dependerá de la producción de cada establecimiento de salud y de la estructura organizativa institucional.

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, algunos insumos de bajo costo e instalaciones simples en el laboratorio. Deben seguir normas básicas sencillas que aseguren calidad y minimicen los riesgos.

Los requisitos mínimos a cumplir son:

- El área de trabajo debe estar alejada de la entrada, para evitar corrientes de aire, así como el movimiento de personal alrededor, durante el procesamiento de las muestras.
- Buena iluminación.
- El laboratorio debe tener, idealmente, extractor de aire para renovarlo una vez finalizado el trabajo, en su defecto debe tener ventanas que permitan la circulación de nuevo aire.
- Desinfección de pisos con solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (partiendo de una concentración del 5%).
- La mesa de trabajo para colocar las muestras que se reciban, y realizar los extendidos debe estar en lo posible cubierta con material liso y resistente a soluciones germicidas (fórmica, acero inoxidable o materiales similares).

Documento Derogado

- Ventilación natural (a través de ventanas) o mecánica (mediante un extractor de aire) de laboratorio, con un caudal aproximado de 6 a 12 cambios del volumen de aire del laboratorio por hora. Si se trata de un extractor de pared, éste debe contar con una salida al exterior hacia un área poco transitada del servicio y a una altura de al menos 2 metros y medio del piso. En todos los casos se debe asegurar que la corriente de aire no esté dirigida a la mesa en la que se preparan los extendidos.
- Paredes pintadas, sin descascaramientos y pisos lavables, que puedan ser desinfectados con hipoclorito de sodio al 0.5% (partiendo de una concentración del 5%).
- Un lavabo con fuente de agua y desagüe, en el que se pueda lavar las manos y realizar la tinción.
- Una alacena para los reactivos, portaobjetos y demás materiales
- Área para el microscopio.
- Una mesa para escribir los informes y los registros del laboratorio.
- Un lugar para almacenar los frotis.

Preparación del extendido

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (PNTYER)/Laboratorio UCSF San Vicente.

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

Cada serie de muestras a procesar, no debe ser superior a doce. Las láminas deben estar nuevas y en buen estado, si es necesario desengrasarlas previamente con alcohol al 70%.

Preparación del extendido:

- 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

Documento Derogado

contaminada, porque sobre ella deben realizarse las etapas más peligrosas de todo el procedimiento, desde la apertura y preparación del extendido hasta el cierre del frasco.

- 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 frascos por lo menos 20 minutos antes de abrirlos.
- Para cada muestra, numerar en el esmeril de una lámina portaobjeto con lápiz de grafito el mismo número asignado de la boleta y el frasco; para el caso del ISSS la identificación de la lámina se hará acorde al lineamiento institucional emitido por el centro de referencia de control de calidad de baciloscopía. Se debe tener la precaución de no tocar con los dedos la parte destinada al extendido porque puede engrasarse.
- Destapar cuidadosamente sólo el frasco 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 frasco se coloca, sobre el papel junto a la lámina correspondiente, comprobando que ambos tengan el mismo número.
- Quebrar el aplicador de madera en dos, utilizando el extremo astillado para mezclar y tomar la partícula útil purulenta, este es uno de los pasos más importantes para aumentar la probabilidad de identificar los bacilos de tuberculosis mediante la baciloscopía.
- Si la muestra es saliva se debe mezclar bien y colocar mayor cantidad de muestra; anotar en la PCT-4 el tipo de muestra que se procesa.
- Tomar la lámina con los dedos en la parte correspondiente al número. Colocar la partícula de muestra sobre la lámina, extendiéndola con el aplicador realizando movimientos suaves circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un óvalo de 2 centímetros de largo por un centímetro de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.
- Para que la película sea realmente homogénea, es necesario tomar una partícula de muestra 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, también en el extendido se forman círculos concéntricos y precipitados granulosos, la película pierde su homogeneidad dificultando la lectura.
- Al terminar el extendido, se deben desechar los aplicadores en un recipiente con hipoclorito de sodio al 0.5%, los extendidos se dejan secar a temperatura ambiente. Las muestras ya procesadas sólo deben ser descartadas después de la observación microscópica, colocándoles a cada frasco 10 gotas de hipoclorito de sodio al 0.5% o fenol al 5%.
- Una vez secos los extendidos fijar la lámina con el extendido hacia arriba, pasándola rápidamente sobre la llama tres veces, cuidando que no se caliente demasiado. El extendido

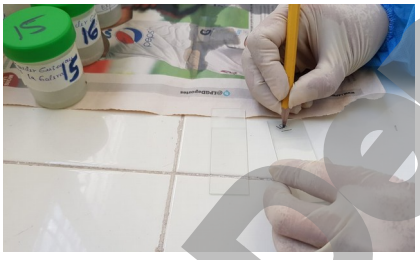
Documento Derogado

nunca debe ser calentado a la llama mientras esté húmedo, pues el calor fuerte altera la estructura de los bacilos y su posterior tinción, además puede generar aerosoles.

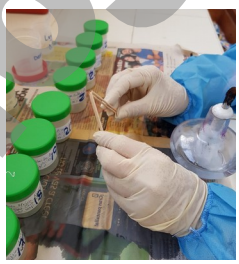
- Colocar los extendidos en un soporte a medida que se van fijando y de inmediato realizar la técnica de coloración ya que algunos bacilos pueden permanecer vivos después de fijados con calor hasta que se incorpora la fucsina.
- Al finalizar el trabajo, deben ser cuidadosamente descartados en el depósito de material bioinfeccioso, el papel periódico, aplicadores y otros materiales utilizados.

Preparación del extendido

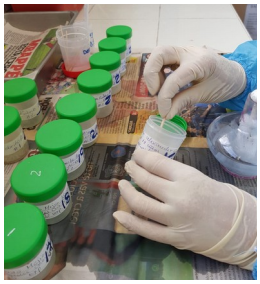
1. Ordenar y enumerar las muestras



2. Enumerar los portaobjetos



3. Quebrar el aplicador



4. Seleccionar y mezclar la partícula más purulenta

5. Depositar la muestra en el portaobjetos

6. Extender la muestra uniformemente

7. Fijar el extendido cuando esté totalmente seco, pasando la lámina rápidamente tres veces sobre la llama del mechero de arriba hacia abajo.

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (PNTYER)/Laboratorio Clínico, UCSF San Vicente.

Coloración

Colorante fuscina fenicada al 0.3%

Decolorante alcohol ácido

Colorante de contraste azul de metileno al 0.1%

El personal de laboratorio debe utilizar la técnica de Ziehl-Neelsen con los siguientes pasos:

- Identificar y filtrar los colorantes antes de utilizarlos.

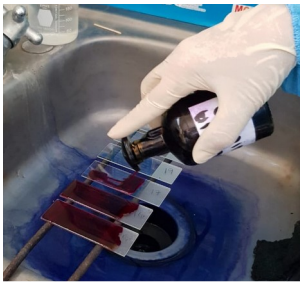
Documento Derogado

- Colocar la serie de láminas fijadas (no superior a 12) sobre la bandeja metálica o 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. No olvidar colocar las láminas de control positivo y negativo de muestras conocidas, previamente preparadas.
- Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con fucsina fenicada.
- Improvisando una pequeña antorcha (algodón impregnado con alcohol en una pinza), pasarla lentamente por debajo de las láminas hasta que se produzca emisión de vapores; cuando estos sean visibles dejar 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 inadecuadamente) 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 *cinco minutos.*
- Eliminar la fucsina tomando el portaobjetos por el extremo numerado, inclinándolo hacia adelante y lavar dejando caer una corriente de agua de chorro a baja presión sobre la parte esmerilada de la lámina (donde no hay extendido), la que escurrirá suavemente sobre la película.
- Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con alcohol ácido por dos minutos haciendo un movimiento de vaivén de modo que el alcohol vaya decolorando y a la vez arrastrando suavemente la fucsina. 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 estructuras teñidas que no son micobacterias.
- Una vez eliminado el alcohol ácido, lavar las láminas cuidando de no desprender la película.
- Coloración de contraste:
    - Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con azul de metileno y dejarlo *un minuto.*
    - Lavar tanto el extendido como la cara inferior del portaobjetos.
    - Limpiar la parte posterior de la lámina (donde no hay extendido), con un algodón humedecido con alcohol, para quitar los restos de colorante.
    - Colocar cada lámina en la gradilla hasta que se seque a temperatura ambiente.

Los reactivos para coloración serán proporcionados por el Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), ya que cuenta con el control de calidad respectivo; en el caso del ISSS serán proporcionados por el laboratorio de la Unidad Médica Atlacatl. (Anexo 7). Preparación de reactivos

Documento Derogado

Tinción de Ziehl-Neelsen

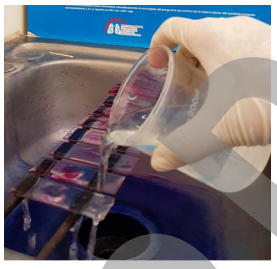


1. Cubrir con fucsina filtrada

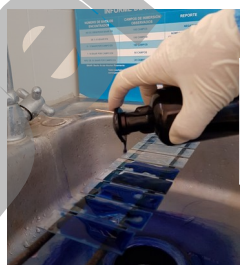
2. Calentar hasta obtener 3 emisiones de vapor. Apagar antorcha y esperar completar 5 minutos.

3. Lavar con agua

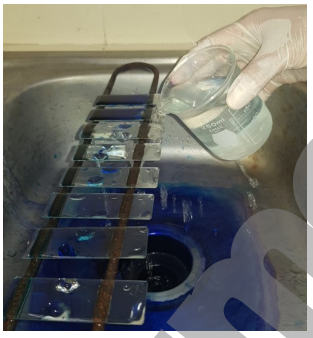
4. Cubrir con decolorante durante 2 minutos



5. Lavar con agua nuevamente

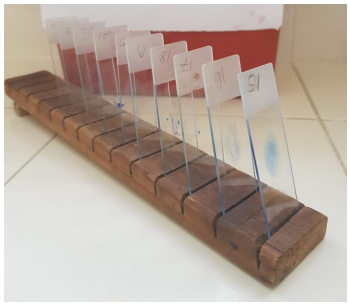


6. Cubrir con azul de metileno durante 1 minuto



7. Lavar con agua

8. Limpiar la parte posterior de la lámina



9. Secado al aire

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (PNTYER)/Laboratorio Clínico, UCSF San Vicente.

Examen microscópico

Observación microscópica y lectura del extendido.

La observación microscópica debe cumplir principalmente dos objetivos:

- Determinar si en el extendido hay BAAR.
- Cuantificar el número de bacilos por campo, si los hay.

Documento Derogado

Características morfológicas del bacilo de la tuberculosis.

Los bacilos ácido alcohol resistentes tienen entre 1 y 10 micras de largo y 0.2 a 0.6 micras de ancho. Con la coloración de Ziehl Neelsen se observan como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, fucsia, destacándose claramente contra el fondo azul.

En la muestra de esputo pueden presentarse aislados, apareados o agrupados. Es muy difícil distinguir el bacilo de la tuberculosis de otras micobacterias por examen microscópico. Algunas micobacterias que no son *M. tuberculosis,* pueden aparecer como bastones muy largos o como cocobacilos.

Otros microorganismos pueden presentar distintos grados de ácido alcohol resistencia, como:

- *Rhodococcus sp.*
- *Nocardia sp.*
- *Legionella sp.*
- Ooquistes de *Cryptosporidium spp.*
- *Ooquistes de Isospora spp.*

Se pueden observan en forma de cocos, bacterias con formas variadas (pleomórficas), filamentos que a veces están cortados, o como esferas de gran tamaño si se les compara con las bacterias.

Es importante considerar que resulta poco frecuente encontrar más de diez microorganismos ácido alcohol resistente diferentes a *M. tuberculosis* en las muestras de esputo de los SR.

Cuando el personal de laboratorio observa algún microorganismo que no tiene forma de bastón debe consultar al supervisor.

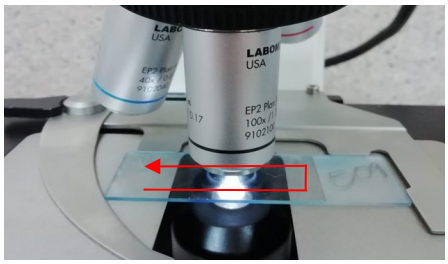
Lectura de extendidos coloreados por Ziehl Neelsen

El personal de laboratorio debe:

- Depositar una gota de aceite de inmersión, sin tocar el preparado con el gotero.
- Enfocar el extendido donde ha colocado la gota de aceite, con la lente 100x de inmersión.

Observar cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el tornillo micrométrico, antes de desplazarse al campo contiguo. Seguir el recorrido en línea recta sistemáticamente para recorrer el extendido, evitando repetir la lectura de algunos campos. Ejemplo: de izquierda a derecha.

Documento Derogado



Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (PNTYER)

- Observar la calidad del extendido y de la coloración. Si no fuesen buenas, repetir nuevamente la baciloscopía de esa muestra.
- Para el examen es necesario microscopio binocular con objetivo de inmersión (100x) y oculares de aumento moderado.
- Examinar un mínimo de 100 campos microscópicos. La lectura debe hacerse de manera sistemática y estandarizada, ajustando levemente con el tornillo micrométrico.
- Después de haber observado un campo microscópico, mover la lámina para examinar el siguiente. De esta manera, ver todos los campos del extendido. El número de campos microscópicos que corresponde a la longitud del frotis es de cien aproximadamente.
- Se considera campo microscópico útil, aquel en el cual se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras mucosas y células). Los campos en los que no aparezcan dichos elementos, no deben contabilizarse en la lectura.
- Cuando no se encuentren bacilos ácido alcohol resistente (BAAR), en 100 campos; se debe hacer una nueva búsqueda más cuidadosa en otros 100 campos.
- Se debe calcular el número de bacilos vistos por campo.
- Al finalizar el examen, se debe separar el objetivo de la lámina, retirarla y verificar la identificación con el número grabado en la lámina y anotar el resultado en el libro de registro de actividades de laboratorio (PCT- 4, anexo 8), posteriormente, se deben anotar los resultados en la solicitud de examen bacteriológico de tuberculosis (PCT-3).
- Antes de examinar un nuevo frotis, se debe limpiar el lente de inmersión con papel para limpiar lentes o algodón impregnado con alcohol al 70%.
- Posteriormente, se debe limpiar el aceite de la lámina y guardarla para su envío al control de calidad.

Informe de resultados.

El número de bacilos encontrados es muy importante como elemento de información, dada su relación con el nivel de contagio del paciente, la severidad de la enfermedad y la evolución del paciente bajo tratamiento. Por esta razón el informe debe ser cualitativo y cuantitativo.

Se recomienda seguir las siguientes pautas para la presentación del informe de los resultados:

Documento Derogado

Cuadro 3. Informe de resultados de BK

Número de bacilos encontrados	Campos de inmersión observados	Reporte	Población bacilar
No se observan BAAR en	**100 campos**	**Negativo**	**a**
De 1 a 9 BAAR en	**100 campos**	**Número exacto de bacilos observados en los 100 campos**	**b**
*** De 0 - 1 BAAR por campo en**	**100 campos**	+	**c**
De 1 - 10 BAAR por campo en	**50 campos**	++	**d**
Más de 10 BAAR por campo en	**20 campos**	+++	**e**

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019. a: Sección Micobacterias, Laboratorio Nacional de Salud Pública. b: Wikimedia Commons. c, d y e: Manual para el diagnostico bacteriológico de la tuberculosis, OMS Parte 1: Manual de actualización de Baciloscopía, edición 2018.

* Para reportar una baciloscopía como positiva una cruz (+), debe de haber visualizado más de 10 bacilos en los 100 campos observados.

Todo resultado positivo, debe informarse inmediatamente al personal del establecimiento de salud correspondiente para iniciar tempranamente el tratamiento del paciente y la identificación de los contactos.

Es responsabilidad del establecimiento de salud correspondiente el retiro de los resultados de pruebas bacteriológicas solicitadas.

Cuadro 4. Causas de error en la baciloscopía

Motivos		Falsos positivos	Falsos negativos
Inherentes a la muestra	No representativa del lugar de la lesión.		X
	Muestra inadecuada.		X
	Mal conservada		X
	Mala selección de la partícula de muestra.		X

Documento Derogado

Inherentes al operador	Defectos en la realización del extendido:		
	• Extendidos finos, gruesos o poco homogéneos.		X
	• Fijación de extendido húmedo o a temperatura superior a 60 ºC		X
	Defectos en la realización de la coloración:		
	• Calentamiento deficiente o excesivo.		X
	• Decoloración insuficiente	X	X
	• Precipitación de cristales por uso de reactivos no filtrados o calentamiento excesivo.	X	
	• Decoloración excesiva.		X
	Defectos en la lectura:		
	• Uso de microscopios en mal estado	X	X
	• Lectura de un número insuficiente de campos		X
	• Poca capacidad para diferenciar bacilos de artificios de coloración.	X	X
	• Observación de un solo nivel del extendido		X
	Transferencia de bacilos de un extendido a otro (varilla de aceite de inmersión)	X	
	Confusión de muestras y/o extendidos.	X	X
	Errores en trascripción de resultados.	X	X
	Hay 1 a 9 bacilos en 100 campos		X
Inherentes a la técnica	Límite de sensibilidad 5,000 -10,000 bacilos/ml de muestra		X
	Especificidad: se detectan BAAR que pueden ser no patógenos y nocardias.	X	

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Cuadro 5. Indicadores operacionales de apoyo del laboratorio

Indicador	Construcción del indicador	Fuente
Carga de trabajo	Número de BK de diagnóstico + número de BK de control de tratamiento	(M 40 + M 42 + M 41) V.E. definir a nivel local
Concentración de baciloscopías por S.R.	Total de BK de diagnóstico/ S.R investigados por el laboratorio	(M 40 + M 42) M 40 V.E. 2
Porcentaje de BK de diagnóstico positivas	Total de BK de diagnóstico positivas al S.R X100/Total de BK de diagnóstico realizadas al S.R	M40(BK+) + M42(BK+) X100 M40 + M42 V.E. 5%

Documento Derogado

Nº de baciloscopías realizadas por caso	Total de BK de diagnóstico realizadas al S.R/*Total de casos BK(+) (nuevos y de retratamiento diagnosticados en el laboratorio)	Registro de actividades de laboratorio (PCT-4)
Porcentaje de BK de control de tratamiento positivas	Número de BK de control de tratamiento positivas x 100/Total de BK de control de tratamiento.	M 41 V.E. 5 – 10%
Porcentaje de BK de diagnóstico positivas de bajo grado (positivas 1+ y contables	Número de BK de diagnóstico positivas de bajo grado x 100/ Total de BK de diagnóstico positivas.	Registro de actividades de laboratorio (PCT-4)

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis por laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

* En el denominador serán tomados los casos diagnosticados, solo por baciloscopía, propios de su establecimiento (tengan o no laboratorio).

Interpretación de indicadores de laboratorio:

- Carga de trabajo: mide el número total de baciloscopías realizadas
- Concentración de baciloscopías por S.R.: mide el número de baciloscopías realizadas en promedio, por cada sintomático respiratorio.
- Porcentaje de BK de diagnóstico positivas: mide el porcentaje de BK(+) del total de BK de diagnóstico realizadas.
- Número de BK realizadas por caso: se obtiene el número de BK realizadas para encontrar un caso BK positivo, sea nuevo o de retratamiento.
- Porcentaje de BK de control de tratamiento positivas: permite identificar si la negativización está siendo adecuada al tratamiento.
- Porcentaje de BK de diagnóstico positivas de bajo grado (positivas 1+ y contables: permite identificar si el diagnóstico es temprano o tardío.

Cultivo

Es el método bacteriológico más sensible y específico de los conocidos en la actualidad, ya que puede detectar entre 10 a 100 BAAR por mililitro en una muestra determinada, si se ha realizado cumpliendo los lineamientos, además permite estudiar los bacilos vivos por técnicas de identificación.

Documento Derogado

Es un método de mayor complejidad y costo que la baciloscopía, cuyos resultados se obtienen entre 20 y 60 días después del procesamiento de la muestra.

Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación de diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15 a 20% del total de casos y en 20 a 30% de los casos de tuberculosis pulmonar.

Entre los casos con tuberculosis 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 tuberculosis.

Su empleo está indicado en los siguientes casos:

- Persona con dos baciloscopías negativas y con alta sospecha de tuberculosis pulmonar
- En niños y niñas con síntomas y signos presuntivos de tuberculosis
- Sospecha de tuberculosis extrapulmonar
- Personas con VIH y que sospecha tuberculosis
- Baciloscopías con uno a nueve bacilos en cien campos
- Pacientes con diabetes mellitus

Indicaciones cultivo más tipificación y sensibilidad

- Sospecha de fracaso.
- Pérdida en el seguimiento.
- Recaída.
- Contacto de tuberculosis multidrogorresistente o cualquier patrón de resistencia del caso índice.
- Antecedentes o estancia actual en centro penitenciario.
- Coinfección TB-VIH.
- No negativiza al segundo o cuarto mes de tratamiento.
- Migrante nacional o extranjero con sospecha de tuberculosis.
- Paciente con tratamiento antituberculoso que no mejora clínicamente, aunque sus baciloscopías de control sean negativas.
- Caso crónico de tuberculosis
- Caso RR o MDR

Documento Derogado

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 tener en cuenta que:

La probabilidad de recuperación aumenta proporcionalmente con la rapidez con que se siembre la muestra de la lesión del paciente.

- 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.
- Es necesario 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 la conservación de la muestra previa al cultivo: de 1 a 5 días, preservarla entre 2 a 8 °C y de 6 a 15 días a menos 70 °C.

Referencia de muestras para cultivo

- Las Unidades Comunitarias de Salud Familiar (UCSF) y los centros penitenciarios deben gestionar el transporte de la muestra al laboratorio clínico de referencia de cultivo, de acuerdo a la RIIS.
- En el caso del ISSS, los centros de atención que no realizan cultivo, enviarán las muestras al centro de referencia de cultivo ubicado en la unidad médica Atlacatl.
- Los laboratorios del SNS que realicen cultivos BAAR deben establecer coordinación con el Laboratorio Nacional de Referencia, para derivar los aislamientos que requieran ser identificados o realizar la prueba de sensibilidad.
- Los informes de los resultados de los cultivos deberán ser retirados por el establecimiento de

Documento Derogado

salud que lo solicitó, por lo que deberá estar pendiente del seguimiento de los mismos.

Elección del método de cultivo según los recursos disponibles

La elección del método a utilizar depende del presupuesto, entrenamiento del personal, equipamiento y de la asistencia técnica.

Cuadro 6. Equipo, materiales y reactivos según método

	Método Petroff modificado	**Ogawa Kudoh**
Equipo:		
Estufa o incubadora	X	X
Cronómetro	X	X
Equipo de protección personal	X	X
Refrigeradora	X	X
Cabina de seguridad biológica clase II tipo 2	X	
Centrifuga Refrigerada	X	
Materiales:		
Mechero	X	X
Bandeja metálica inclinada	X	X
Dos tubos de medio de cultivos Löwenstein Jensen	X	X
Gradilla para láminas	X	X
Gradilla para tubos de 20 x 125 milímetros	X	X
Recipiente para descarte de desechos bioinfecciosos	X	X
Láminas porta objeto esmeriladas	X	X
Aplicadores de madera	X	X
Basurero con tapadera y con sus respectivas bolsas plásticas (roja y negra)	X	X
Jabón para lavado de manos	X	X
Papel periódico	X	X
Plumón permanente	X	X
Lápiz de grafito	X	X
Lapicero	X	X
Papel toalla	X	X
Fósforos	X	X

Documento Derogado

Hoja de solicitud del examen (PCT-3)	X	X
Libro para registro de cultivo	X	X
Goteros estériles	X	
Gradilla para tubo cónico de 50 mililitros	X	
Dos hisopos de poliester o de algodón estériles de quince milímetros de longitud en promedio		X
Descarte de objetos punsocortantes	X	X
Reactivos:		
Hipoclorito de sodio al 0.5% o fenol al 5%	X	X
NaOH al 4% estéril	X	
Buffer fosfato pH 6,8 estéril	X	
Agua destilada estéril	X	
Un tubo de vidrio estéril conteniendo tres mililitros de solución de NaOH al 4% por cada muestra a procesar		X

Fuente: Equipo técnico, Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Las micobacterias son microorganismos aerobios estrictos por lo que las necesidades básicas de nutrientes de las especies cultivables son en general sencillas: el glicerol o la glucosa como fuente de carbono, y una sal de amonio como fuente de nitrógeno. Aquellas muestras que provienen de sitios no estériles (por ejemplo orina, esputos entre otras) deben descontaminarse previamente.
Mediante la decontaminación de la muestra se eliminan otros microorganismos que impiden el desarrollo adecuado del bacilo.
La muestra debe homogenizarse, especialmente el esputo, con el fin de lograr su licuefacción y liberar el bacilo del moco, así como material celular y tejido que puedan acompañarlo.
El empleo de decontaminantes adecuados además de homogenizar la muestra, permite la destrucción de los gérmenes asociados, conservando la viabilidad del bacilo.

Método Ogawa – Kudoh

Debe utilizarse para procesar esputos en laboratorios sin equipamiento adecuado o suficiente para aplicar la técnica de Petroff. Si no se dispone de cabina de seguridad biológica, deben aplicarse las prácticas y medidas de bioseguridad recomendadas para la realización de la baciloscopía.

Procedimiento

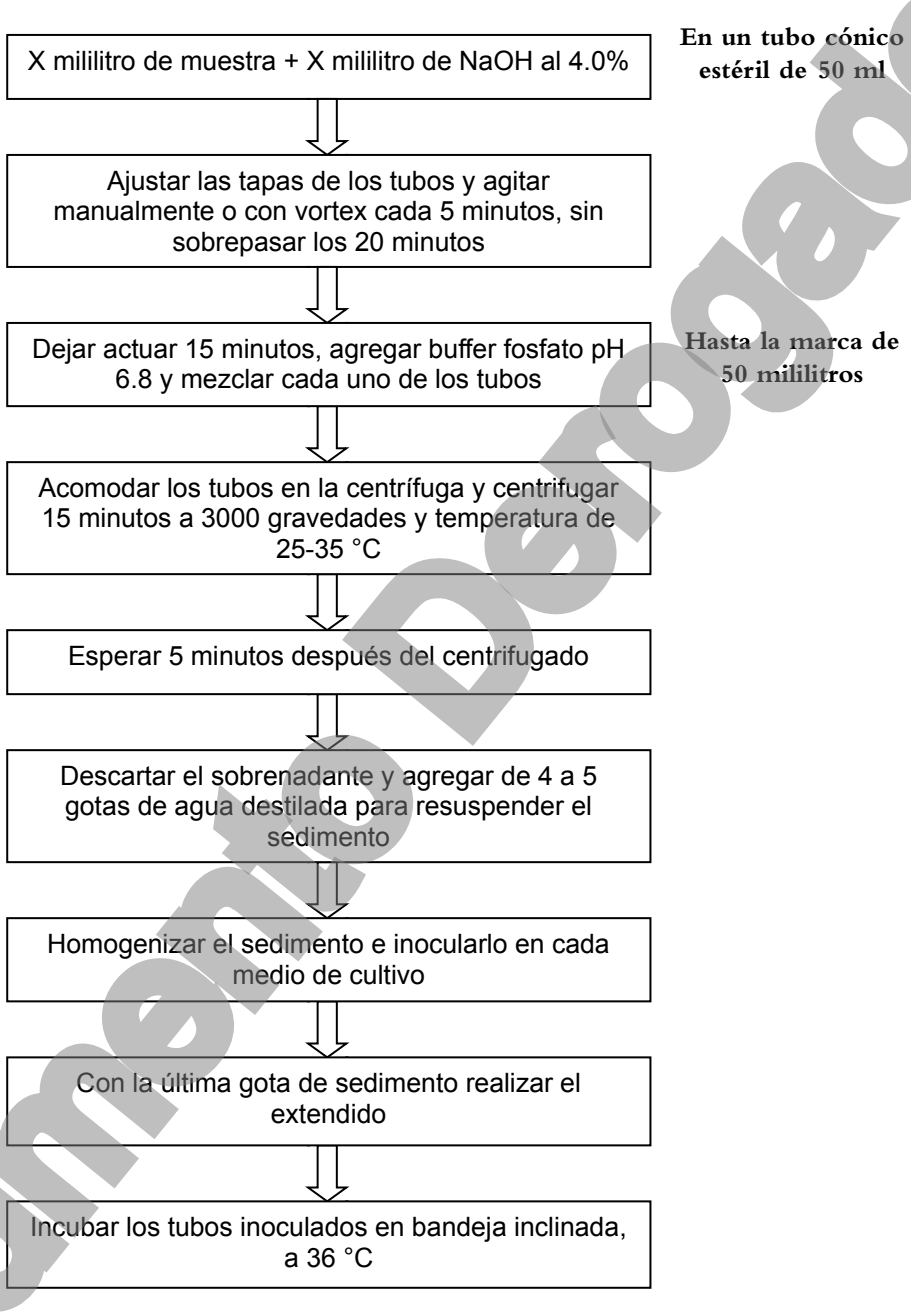
- Colocarse el equipo de protección personal.

Documento Derogado

- Preparar la mesa de trabajo.
- Verificar los datos de la muestra del paciente con la PCT-3 y asignar el número correlativo.
- Identificar los tubos con el medio de cultivo, con los datos correspondientes.
- Proceder a hacer un extendido con la lámina ya identificada utilizando un palillo.
- Abrir el 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 exactos.
- Retirar el hisopo sin escurrir y sembrar con él un tubo con medio de Ogawa acidificado, con movimientos de rotación y presión. Descartar el hisopo.
- Repetir el procedimiento utilizando el mismo NaOH al 4% e inocular el segundo tubo en medio de Ogawa.
- Descartar los hisopos en un recipiente destinado a ser esterilizado en el autoclave.
- Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar a 36 °C.
- A las 48 horas enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

Documento Derogado

Flujograma del método de Petroff con Buffer Fosfatos



Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

Es importante recalcar que se debe asignar un día de la semana para realizar la lectura y revisión de los cultivos.

Documento Derogado

Método de Petroff modificado

- 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.

Procedimiento

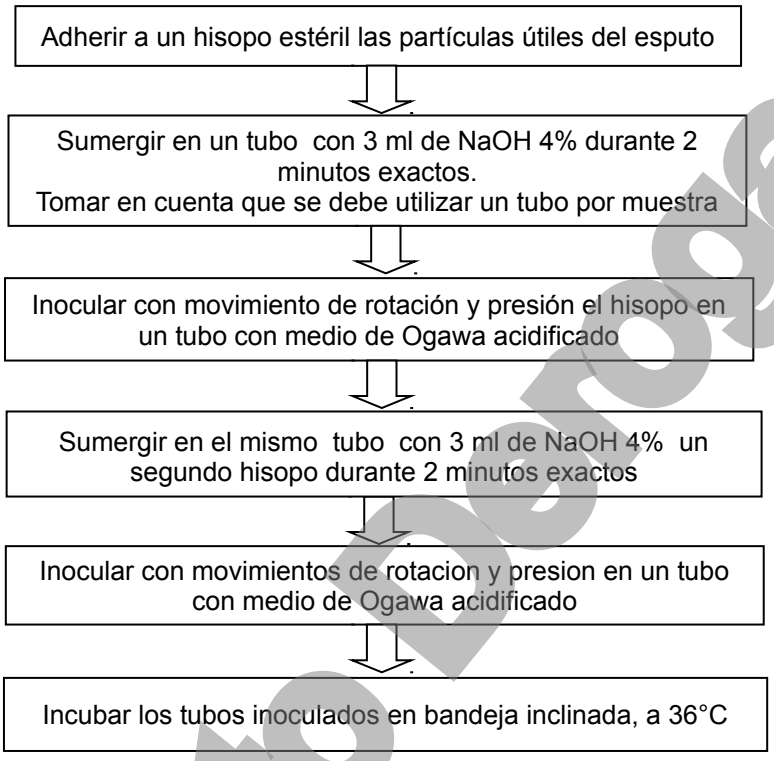
El profesional de laboratorio debe de tener en cuenta que el tiempo de contacto con el decontaminante no debe de exceder de los 30 minutos, de manera tal que normalmente no es posible procesar series de más de 12 muestras.

Muestras pulmonares:

- En un tubo cónico de 50 mililitros, estéril, transferir de 1 a 2 mililitros de muestra.
- Proceder de la misma manera con las siguientes muestras de una en una. No abrir el siguiente tubo si antes no se ha cerrado el anterior.
- Agregar de 1 a 2 mililitros de NaOH al 4% a cada tubo.
- Mezclar cada tubo, manualmente o con ayuda de vortex, cada 5 minutos hasta que completen 15 minutos, sin sobrepasar los 20 minutos.
- Agregar buffer fosfato pH 6.8, a cada tubo, hasta completar la marca de 50 mililitros y mezclar hasta homogenizar.
- Centrifugar los tubos a 3,000 gravedades y temperatura entre 25 y 35 grados centígrados por 15 minutos.
- Dejar reposar 5 minutos, sacar las camisas de la centrífuga y llevarlas a la cabina de seguridad biológica (CSB).
- Dentro de la CSB sacar los tubos de uno en uno, destapar y decantar el sobrenadante, limpiando la boquilla del tubo con un algodón humedecido con fenol al 5% o con hipoclorito de sodio al 0.5%, luego taparlo hasta completar la serie de 12 tubos.
- Volver a destapar el tubo y re-suspender el sedimento con 4 o 5 gotas de buffer fosfato o con agua destilada.
- Proceder de la misma manera con los tubos restantes.
- Inocular los tubos con medio de cultivo Löwenstein Jensen (LJ), agregándoles de 4 a 5 gotas del sedimento y dispersar de manera tal que quede en toda la superficie del medio.
- Con la última gota preparar el frotis para realizar una baciloscopía.
- Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar a 36 °C.
- A las 48 horas enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

Documento Derogado

Flujograma del método Ogawa Kudoh



Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019

Muestras extrapulmonares

Las muestras de líquido cefalorraquídeo, nódulos linfáticos, biopsias de otros tejidos y otros líquidos, pueden requerir homogenización, concentración o decontaminación, previo a ser procesadas para cultivos. Estos procedimientos se hacen de forma habitual pero dentro de una cabina de seguridad biológica tipo II A2 y en un laboratorio de contención.

Procedimiento para líquido cefalorraquídeo y otros líquidos

- Inocular de 2 a 3 tubos de medio de Löwenstein Jensen con 3 a 5 gotas de muestra.
- Dispersar sobre la superficie del medio.
- Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar a 36 °C.
- A las 48 horas revisar en busca de contaminación y si no se observa enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación. En caso de observarse contaminación proceder a realizar la decontaminación con la técnica de Petroff modificada.

Documento Derogado

Procedimiento para maceración de muestras de tejidos 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 una pipeta Pasteur o 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 muestras que serán descontaminadas para que sea procesado mediante la técnica de Petroff.
- Si se trata de una muestra 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 descontaminar.
- 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.
- Inocular de 2 a 3 tubos de medio de Löwenstein Jensen con 3 a 5 gotas de muestra.
- Dispersar sobre la superficie del medio.
- Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar a 36 °C.
- A las 48 horas revisar en busca de contaminación y si no se observa enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

Procedimiento para cultivo de muestra de orina

- Procesar toda la muestra de la micción o un mínimo de 50 mililitros.
- Centrifugar toda la muestra a 3000 gravedades por 15 minutos.(Elaborar cuadro de equivalencia de RPM).
- Decantar los sobrenadantes y depositar en un tubo cónico de 50 mililitros todos los sedimentos obtenidos.
- Decontaminar con el método de Petroff.
- Inocular de 2 a 3 tubos de medio de Löwenstein Jensen con 3 a 5 gotas de sedimento.
- Dispersar sobre la superficie del medio.

Documento Derogado

- Colocar en bandeja inclinada los tubos inoculados, con el bisel hacia arriba, dejando flojos los tapones, e incubar a 36 °C.
- A las 48 horas revisar en busca de contaminación y si no se observa enroscar bien los tapones, revisarlos cada semana hasta observarse crecimiento o que cumplan las 8 semanas de incubación.

Es importante recalcar que se debe asignar un día de la semana para realizar la lectura y revisión de los cultivos. En caso de que se identifique colonias sugestivas al complejo *Micobacterium tuberculosis*, referir al LNR, el aislamiento acompañado de la hoja de referencia de cepa, para su identificación.

a. Preparación de las muestras para cultivo BAAR

- Se debe procesar la totalidad de cada muestra para no perder material que pueda contener bacilos. 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

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 descontaminadas para que sea procesado mediante la técnica de Petroff.

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 de no re-suspender el sedimento, trasladarlos a la cabina. Dejar reposar los tubos cinco minutos antes de abrirlos.

Documento Derogado

- 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.

c. Revisión y lectura de las muestras cultivadas

- Controlar periódicamente los tubos inoculados.
- 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.
- 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.
- Toda muestra extrapulmonar, debe ser resguardada, un máximo de 3 a 5 días, previo a la verificación que el tubo no se haya contaminado.
- 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.

Período de lectura a los siete días pos siembra y luego una vez por semana:

- Identificar tubos contaminados y proceder como se ha descrito anteriormente (Anexo 9).
- 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.

Documento Derogado

Selección de los cultivos positivos para identificación (tipificación)

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

- Seleccionar los cultivos positivos para su identificación y prueba de sensibilidad en caso que el paciente pertenezca a grupos en riesgo y vulnerabilidad.
- Derivar al LNR todos los tubos positivos, que requieren prueba de sensibilidad y tipificación, en triple embalaje. Los cuales deben ir acompañados de la hoja de referencia de cepas para prueba de sensibilidad/tipificación. (Ver anexo 10) y la hoja de solicitud de examen bacteriológico para tuberculosis.
- Transcribir el resultado obtenido de los registros del laboratorio en la PCT-3, utilizando la escala descrita en el cuadro 7, cuantificar los resultados positivos.
- Informar los cultivos positivos y los totalmente contaminados en el mismo día que son detectados.
- Cuando la lectura es visual, informar los cultivos negativos al finalizar la octava semana de incubación de los medios a base de huevos.

Cuadro 7. Registro de resultados de cultivo

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

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019/Sección Micobacterias de Laboratorio Nacional de Salud Pública (LNSP)

Descarte de tubos inoculados

Documento Derogado

Descartar los tubos, resultantes de la lectura, en un recipiente donde serán esterilizados en autoclave durante una hora a 121 °C.

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 bioseguridad, durante la agitación y centrifugación de tubos los cuales generan aerosoles infecciosos; ya que el riesgo es mayor cuanto mayor sea la carga de bacilos que contenga la muestra.

Contaminación cruzada

El personal de laboratorio debe evitar situaciones que pueden dar una contaminación cruzada, entre ellas, la transferencia de microorganismos, de una muestra a otra al ser procesadas en serie en el laboratorio.

Son condiciones propicias para este tipo de contaminación en el laboratorio: sobrecarga de trabajo, alta frecuencia de muestras con baciloscopía positiva en la rutina, procedimientos poco rigurosos, utilización de reactivos no alicuotados.

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.

Morfología de las colonias

Las colonias de *Mycobacterium tuberculosis* son habitualmente rugosas, secas, sin pigmentación y con aspecto de migas de pan, además son de crecimiento lento.

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*; si se tiene experiencia, es posible orientar con mucho acierto si se ha aislado el bacilo de la tuberculosis.

Cuando el medio de cultivo está muy húmedo, las colonias de cualquier micobacteria aparecen lisas. Si las colonias se desarrollan lentamente, no tienen pigmentación, son lisas, pequeñas o brillantes, se presenta la duda acerca si lo que se ha aislado es una micobacteria ambiental.

Documento Derogado

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 inoculo es muy alto.

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*.

Preparación de materiales, medios y reactivos

Cuadro 8. Medios a base de huevos

			Löwenstein Jensen	Stonebrink	Ogawa	Ogawa Kudoh (ácido)
Solución salina	Fosfato monopotásico KH_2PO_4	g	2.4	3.5	6	12
	Fosfato disódico HNa_2PO_4	g		1.6		
	Sulfato de magnesio $SO\,Mg.\,7H_2O$	g	0.24			
	Citrato de Magnesio	g	0.6			0.6
	Glutamato de sodio	g			6	3
	Piruvato de sodio	g		6.25		
	L-asparagina	g	3.6			
	Glicerol	ml	12		36	24
	Agua destilada c.s.p.	ml	600	500	600	600
Huevos		ml	1000	1000	1200	1200
Verde de malaquita 2%		ml	20.0	20.0	36	24
pH aproximado			6.8	6.8	6.8	6.2

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019.

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 tuberculosis pulmonar confirmada bacteriológicamente, en alguna de las siguientes categorías:

a. Baciloscopía (+) y cultivo (+)

Documento Derogado

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:

Método de Petroff modificado y Ogawa Kudoh	**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 BK(+) Cultivo (-)	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 contaminados	3-5	F	G

A	Errores de lectura de baciloscopías: «falsos negativos». 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)
C	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
D	Errores de lectura de baciloscopías: «falsos positivos»
E	Tendencia a asignar a la baciloscopía una positividad mayor a la real
F	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 • Descuidos en procedimientos que requieren esterilidad (mal uso de mechero y/o de la cabina de seguridad biológica, excesivo movimiento de gente en el área de trabajo, generación de corrientes de aire por ventiladores o equipo de aire acondicionado, otros.)
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 alto que lo normalizado

Fuente: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, parte 2. El cultivo, OPS/OMS, 2008

Documento Derogado

Prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico

Es una prueba molecular que detecta mutaciones en el gen rpoB que codifica para la subunidad beta, del ácido ribonucleico (ARN) polimerasa, del complejo *M. Tuberculosis* y la resistencia a rifampicina en menos tiempo (2 horas).

Se realiza en forma directa, es decir, a partir de muestras tanto pulmonares como extrapulmonares, sin necesidad de esperar el resultado del cultivo.

Ventajas

- Es adecuado para todos los niveles de laboratorios con una infraestructura apropiada y con una carga de trabajo acorde a la capacidad de la máquina de Xpert MTB/RIF.
- Detecta tanto tuberculosis como resistencia a rifampicina en el mismo cartucho.
- Puede ser usada como prueba diagnóstica independiente.

Desventajas

- Requiere suministro de electricidad estable e ininterrumpida.
- Calibración anual de los módulos.
- Ambiente con temperaturas entre 15 a 30 °C.
- Los cartuchos y reactivos deben ser almacenados entre 2-28 °C.
- La prueba no debe ser utilizada para el seguimiento del tratamiento.
- La prueba de sensibilidad a drogas (PSD) es aún requerida para la detección de resistencia a otras drogas diferentes a rifampicina.

Motivos para indicar la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico

- SR con 2 baciloscopías negativas y con tuberculosis presuntiva.
- Persona con VIH.
- Privado de libertad o antecedente penitenciario.
- SR con diabetes.
- SR con inmunodeficiencias.
- Caso tuberculosis que no negativiza al 2do. o 3er. Mes.
- Retratamientos (recaída, fracaso, pérdida en el seguimiento)
- Sospecha de tuberculosis extrapulmonares.
- Contacto de caso TB/MDR.
- Niños.
- Personal de salud.
- Otros (especificar).

Documento Derogado

- Indicación por resultado previo.

Estos motivos no aplican para muestras de materia fecal, orina o sangre y no deben ser procesadas en el a través de prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico, debido a su poca utilidad.

Principios de la prueba

- Es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (amplificación y detección al mismo tiempo).
- Sistema completo de control interno de los reactivos, por lo que no tiene la necesidad de utilizar controles externos positivos y negativos por separado.
- Ultrasonido integrado para la rápida lisis de la célula para liberar el Ácido desoxirribonucleico (ADN).
- Los motores son dirigidos por el software para realizar el movimiento de las válvulas y accionadores hidráulicos acoplados.
- Cuenta con tecnología de fluido inteligente, ya que los líquidos fluyen directamente por micro válvulas y permite el uso de cantidades mínimas de los componentes de la reacción.
- La interpretación de los resultados y análisis de los datos ocurre de manera automática.

Preparación de la muestra

Esputo

- Abrir el frasco de esputo cuidadosamente.
- Añadir directamente en el frasco de la muestra, 2 volúmenes de buffer para un volumen de muestra (proporción 2:1), evitando la formación de aerosoles.
- Otra opción en el caso de muestras demasiado viscosas y/o que superen el volumen recomendado es: diluir la muestra, colocando un aproximado de 2 ml de esputo en un recipiente aparte con graduación volumétrica.
- 1 mililitro de esputo es la cantidad mínima, pero de 3-4 mililitros es la cantidad requerida ideal).
- Para volumen de muestra mayor de 4 mililitros, será necesario tomar una porción de reactivo de muestra en un segundo frasco, ya que cada frasco contiene una cantidad de 8 mililitros de reactivo.
- Tape y cierre bien el frasco y agite enérgicamente de 10 a 20 veces o utilice un mezclador vortex durante 10 segundos como mínimo.
- Esperar a que la muestra se homogenice, mezclando cada 5 minutos por 15 minutos.
- Luego agitar nuevamente de 10 a 20 veces o utilice un mezclador vortex durante 10 segundos como mínimo.
- Después de homogenizada la muestra, esperar por 5 minutos e inocule 2.0 mililitros de la muestra inactivada dentro del cartucho.

Documento Derogado

Muestras concentradas

- Utilización de esputo procesado: se puede utilizar el sedimento resultante de la decontaminación por el método de Petroff.
- LCR y otros líquidos: pueden ser procesados de una manera similar a la del esputo; sin embargo, la concentración de la muestra por centrifugación proporciona mejores resultados en la prueba.

Se requiere un laboratorio con una cabina de seguridad biológica (CSB) para abrir las camisas de la centrífuga y decantar el sobrenadante.

Procedimiento:

- Añadir 1.5 mililitros de buffer a 0.5 mililitros del sedimento de la muestra de esputo descontaminado/concentrado, LCR o cualquier otro líquido que necesite el análisis.
- Cerrar la tapa del frasco y agite enérgicamente de 10 a 20 veces o utilice un mezclador vortex durante 10 segundos como mínimo.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Luego agitar nuevamente de 10 a 20 veces o utilice un mezclador vortex durante 10 segundos como mínimo.
- Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Transcurrido el tiempo de incubación, la muestra debe estar líquida antes de ser procesada.
- Verificar que se encuentra sin grumos visibles.
- Después de homogenizada la muestra, esperar por 5 minutos e inocule 2.0 mililitros del sedimento o concentrado dentro del cartucho.

Nódulos linfáticos y tejidos

- Las muestras de tejidos necesitan ser homogenizadas usando mortero con pistilo.
- Estas pueden generar aerosoles por lo que las muestras deben ser procesadas en CSB.
- Cuando el volumen de una muestra es suficiente, el cultivo puede hacerse simultáneamente.
- Cortar la muestra de tejido utilizando tijeras y pinzas estériles, y colocarla en un mortero.
- Añadir 2 mililitros de solución salina y con ayuda de un pistilo, comience a triturarlo hasta obtener una suspensión homogénea.
- Dejar en reposo para que las partículas mayores sedimenten en el fondo (5-10 minutos).
- Colocar 0.7 mililitros del sobrenadante en un tubo cónico con tapa de rosca (asegúrese que no se transfieran grumos de tejido).

Documento Derogado

- Añadir 1.4 mililitros del buffer.
- Procesar como se describe para la realización de la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico para muestras de esputo.
- Inocular el cartucho con 2 mililitros de muestra inactivada.
- Se recomienda también realizar un cultivo del sobrenadante de la muestra de tejido.

Preparación del cartucho

- Preparar el número de muestras de acuerdo a la cantidad de módulos disponibles en el equipo para la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico (o sea, solo los que se encuentren en funcionamiento).
- Iniciar la preparación de las muestras dentro de los 30 minutos antes que un módulo esté disponible.
- No abrir el cartucho hasta estar próximo a realizar la prueba.
- Utilizar el cartucho dentro de 30 minutos después que haya sido abierto.
- Tomar el cartucho sólo por los lados.
- No tocar el código de barras o el tubo de reacción en la parte trasera.
- Identificar el cartucho con el número de muestra, escribiendo al lado del cartucho o pegue la etiqueta de identificación.
- No poner la identificación en la cubierta del cartucho ni obstruya el código de barras 2D.
- Abrir el cartucho y deposite 2 mililitros de la muestra preparada usando la pipeta plástica de transferencia (suministrada en el kit).
- Introducir la muestra cuidadosamente.
- Cerrar la tapa firmemente.
- Iniciar la prueba.

Cuidados

- Evitar pipetear cualquier partícula sólida de la muestra al cartucho.
- Evitar la formación de burbujas al pipetear la mezcla de la muestra al cartucho.
- No utilizar el cartucho: si la fecha de uso ha caducado, la tapa de cierre está rota o ha sido accidentalmente abierta y se encuentre húmedo.
- Se ha caído o sacudido el cartucho después de haber agregado la muestra preparada.
- El tubo de reacción en la parte posterior parece haber sido dañado.
- Cada cartucho es para un solo uso, y no se puede volver a utilizar una vez que ha sido escaneado.

Documento Derogado

Cuadro 11. Equipo y materiales para prueba molecular

Equipo	Materiales
Refrigeradora	Kits de cartuchos de la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico
Equipo para la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico con computadora (laptop o PC) y lector de código de barras	Kits de cartuchos de calibración
Aire acondicionado	Pipetas estériles del kit, descartables 1 por prueba
Autoclave	Reactivo inactivador para muestras: frascos de 8 ml, 1 por prueba.
Cronómetro	Tubos cónicos de 15 o 50 mililitros (opcional)
Equipo de protección personal	Papel toalla
	Algodón
	Alcohol al 70%
	Mechero
	Fósforos
	Hipoclorito de sodio al 2%
	Papel periódico

Fuente: Equipo técnico MINSAL, 2019

Es recomendable que exista un punto de red para establecer comunicación con el proveedor del equipo para correcciones, mantenimiento o fallo del equipo.

Inicio de la Prueba

- El dispositivo de la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico, ya debe de estar encendido (una pequeña luz azul aparece en el panel frontal).
- Iniciar sesión en Windows como :
  - Nombre de usuario: *Cepheid*, contraseña: cphd.
- Hacer doble click en el icono *«Gene Xpert Dx»* en el escritorio.
- Acceder con la cuenta de usuario.
- Hacer click en «*no*» en el cuadro de diálogo «Gestión de Base de Datos» para empezar el día de trabajo.
- Hacer click en *Check Status* para confirmar que todos los módulos están disponibles.
- Hacer click en *«Creat test».*
- Abrir una ventana solicitando escanear el código de barras del cartucho.

Documento Derogado

- Tomar el lector de código de barras y escanear el código de barras del cartucho manteniendo presionado el botón amarillo.
- Atención: si el escáner no funciona se puede introducir manualmente el código de barras escribiendo los números que aparecen en las dos líneas del cartucho.
- Después de haber escaneado el código de barras, aparecerá una ventana en la que se introducirá el nombre de identificación del paciente y la identificación (ID) de la muestra.
- De forma predeterminada, el software en pantalla muestra el tipo de prueba a realizar.
- El módulo donde se coloca el cartucho se selecciona automáticamente, pero puede ser seleccionado de forma manual.
- Hacer click en start test.
- Abrir completamente la puerta del módulo elegido indicada por una luz verde parpadeante por encima del módulo seleccionado.
- Insertar el cartucho cuidadosamente con el código de barras hacia adelante.
- Al cerrar la puerta del módulo con el cartucho, la prueba se iniciará automáticamente.

Manejo de desechos.

Se lleva a cabo siguiendo las normas vigentes en el país para el manejo de desecho biológico infeccioso.

Cuadro 12. Interpretación de resultados de prueba molecular

Resultado del Equipo	Reportar
MTB no detectado	Negativo
MTB detectado resistencia a rifampicina no detectada	MTB sensible a rifampicina
MTB detectado resistencia a rifampicina detectada	MTB resistente a rifampicina. Solicitar una muestra adicional para realizar cultivo y PSD, para determinar el perfil completo de resistencia a fármacos y confirmar TB-MDR
MTB detectado resistencia a rifampicina indeterminado	Reportar tal como lo da el equipo y solicitar nuevas muestras para cultivo y para la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico
Invalido, error, no resultado	No se reporta este resultado del equipo y repetir la prueba con la misma muestra
Persistencia de invalido, error, no resultado	No se reporta este resultado del equipo y solicitar nueva muestra

Fuente: GeneXpert Dx System Operator Manual. Rev. C June 2012.

Estabilidad de la muestra ya inactivada

Las muestras inactivadas son estables a temperatura ambiente por 5 horas; si no es posible procesarlas pueden mantenerse hasta 12 horas en refrigeración a temperatura entre 2 y 8 grados centígrados.

Documento Derogado

Cada equipo debe ser monitoreado mensualmente usando el siguiente conjunto mínimo de indicadores para evaluar el uso adecuado:

- Número de pruebas realizadas por mes.
- Número y proporción de MTB detectado, resistencia a RIF no detectada.
- Número y proporción de MTB detectado, resistencia a RIF detectada.
- Número y proporción de MTB detectado, RIF indeterminada.
- Número y proporción de MTB no detectado.
- Número y proporción de errores.
- Número y proporción de resultados inválidos.
- Número y proporción de ausencia de resultados.

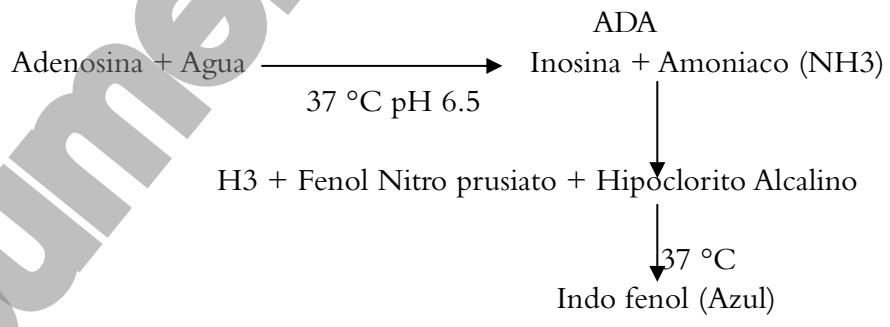
Adenosin deaminasa

Es una enzima que participa en el catabolismo de las purinas, la cual cataliza la deaminación de adenosina para formar inosina y amoniaco.

Su actividad fisiológica está relacionada fundamentalmente con la proliferación y diferenciación linfocítica, por esta razón, su actividad se encuentra elevada en los procesos inmunes mediados por células.

Su determinación se realiza en líquidos cefalorraquídeo, pleural, ascítico, pericárdico, peritoneal y sinovial, ya que su determinación en suero sanguíneo no tiene ningún valor como ayuda diagnóstica.

Esquema 1: fundamento de la prueba adenosin deaminasa



La determinación se basa en la cuantificación del amoníaco (NH3), producido al poner en contacto la adenosina (sustrato) con la adenosin deaminasa (ADA), presente en la muestra en condiciones adecuadas de pH, tiempo y temperatura. El amoniaco producido es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra.

Condiciones de la muestra y sustancias que interfieren en los resultados

Documento Derogado

- Utilizar como anticoagulante el oxalato de sodio o citrato de sodio a una concentración de 1 miligramo por mililitro.
- La heparina produce inhibición de la enzima.
- Hemólisis: produce falsos resultados positivos por la concentración de amonio dentro de los eritrocitos.
- Muestras purulentas: produce falsos resultados positivos por la producción de amonio de las bacterias colonizantes.
- La muestra es estable por 24 horas entre 2 a 8 °C y seis meses a menos 20 °C.

Cuadro 13. Equipo, materiales y reactivo para ADA

Equipo	**Material**	**Reactivos**
Espectrofotómetro	Balón volumétrico de 100 mililitros, 500 mililitros, 1000 mililitros	Fosfato dibásico de sodio Na2HPO4 12H2O
Medidor de Ph	Pipeta automáticas de 5 a 50 microlitros	Fosfato ácido de sodio NaH2PO4H2O
Balanza analítica o semianalítica	Pipeta automáticas de 100 a 1000 microlitros	Agua desionizada o agua destilada
Baño maría húmedo	Puntas plásticas nuevas	Sulfato de amonio (NH4)2SO4
Mezclador	Frascos ámbar de 500 y 1000 mililitros	Fenol en cristales o líquido
Centrífuga	Tubo de vidrio estéril 13 x 100 milímetros	Nitroprusiato de sodio
Cocina o mechero	Papel para film (papel sellador)	Hipoclorito de sodio
Refrigerador	Gradilla para tubos 13 x 100 milímetros	Hidróxido de sodio en lenteja
Cronometro	Erlenmeyer de 250 a 500 mililitros	Adenosina pura
Termómetro		Patrones de Ph 4, Ph 7 y Ph 10

Fuente: Equipo técnico Lineamientos técnicos para el diagnóstico y control de la tuberculosis en el laboratorio clínico, MINSAL, 2019

Cuadro 14. Procedimiento para la curva de calibración de adenosin deaminasa.

	Blanco	Patrón I 25 unidades/litro	Patrón II 50 unidades/litro	Patrón III 75 unidades/litro
Patrón	-	100 micro litros	100 micro litros	100 micro litros
Buffer	100 micro litros	-	-	-
Incubar en baño maría a 37 °C por 60 minutos				
Fenol Nitroprusiato	300 micro litros	300 micro litros	300 micro litros	300 micro litros
Mezclar bien inmediatamente cada tubo				
Hipoclorito Alcalino	300 micro litros	300 micro litros	300 micro litros	300 micro litros

Fuente: Equipo técnico MINSAL, 2019

Documento Derogado

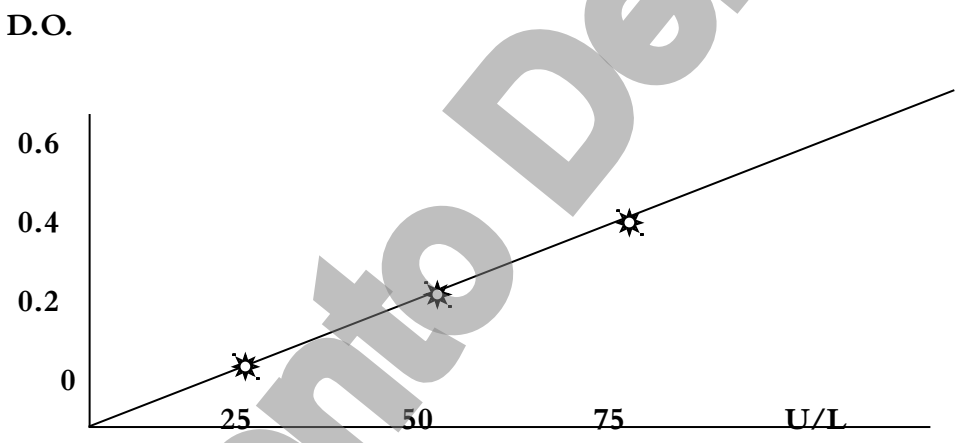
Procedimiento:

- Mezclar inmediatamente e incubar en baño maría a 37 °C por 30 minutos.
- Leer la absorbancia a 628 nanómetros o entre 620 y 650 nanómetros frente al blanco.
- Graficar en papel milimetrado, ubicando la concentración de los patrones. 25 unidades/litro, 50 unidades/litro y 75 unidades/litro sobre el eje de las X y las absorbancias correspondientes sobre el eje de las Y.
- Trazar una línea partiendo de cero que deberá pasar por lo menos dos de los tres puntos graficados, de lo contrario se debe de repetir la curva de calibración.
- De persistir el error se debe preparar un nuevo lote de reactivos.

Curva de calibración: microtécnica

La curva de calibración se realiza cada vez que se prepara un nuevo lote de reactivos y su finalidad es comprobar la linealidad del método.

Ejemplo:



La curva de calibración no se utiliza para obtener la concentración de las muestras, solamente se utiliza para comprobar la linealidad del método.

Procesamiento de muestras

Para procesar las muestras el profesional debe tener en cuenta que:

- Para cada una de las muestras, incluir su correspondiente blanco
- Restar la absorbancia obtenida a la absorbancia de la muestra
- Incluir blanco de Adenosina y tenerlo en cuenta para el cálculo final
- Utilizar el patrón de 50 Unidades/litro, porque tiene un valor intermedio

Documento Derogado

Cuadro 15. Procedimiento para procesamiento de muestras

	Blanco reactivo	Blanco Adenosina	Patrón II	Blanco muestra	Muestra
Buffer Fosfato	100 microlitros	-	-	100 microlitros	
Solución de Adenosina	-	100 microlitros	-	-	100 microlitros
Patrón II	-	-	100 microlitros	-	-
Muestra	-	-	-	5 microlitros	5 microlitros
Agua destilada	5 microlitros	5 microlitros	5 microlitros	-	-
Incubar a 37 °C por 60 minutos					
Fenol Nitroprusiato	300 microlitros	300 microlitros	300 microlitros	300 microlitros	300 microlitros
Mezclar inmediatamente					
Hipoclorito Alcalino	300 microlitros	300 microlitros	300 microlitros	300 microlitros	300 microlitros
Mezclar inmediatamente					
Incubar en Baño de Maria a 37°C por 30 minutos					

Fuente: Bacteriología del *M. tuberculosis* y de Micobacterias No Tuberculosas. Manual de Procedimientos, Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia. Bogota D.C. Mayo de 2001.

Leer la absorbancia a 628 nanómetros (o entre 620 – 650 nanómetros) llevando a cero con agua destilada.

Registrar cada una de las lecturas de los tubos procesados, incluyendo la del blanco reactivo.

Si no se posee equipo para micro técnica, se puede duplicar los volúmenes. Esto no implica cambio en los cálculos finales.

Recomendaciones

- Tapar los tubos para evitar evaporación durante la incubación.
- Mezclar cada tubo inmediatamente después de agregar el hipoclorito alcalino.
- Registrar todas las lecturas.
- La absorbancia del blanco reactivo contra el blanco de agua destilada no debe ser mayor de 0.040 nanómetros, en caso contrario revisar la limpieza del material utilizado y los reactivos para descartar contaminación.
- Cuando la absorbancia de la muestra sea mayor a 1.0, diluya de 2 a 5 veces con agua destilada, repetir el ensayo y multiplicar el resultado final por el factor de dilución.

Fórmula para encontrar la concentración de ADA en unidades/litro

$$\text{Actividad} = \frac{A - B}{C} \times 50 = \text{ADA en unidades/litro}$$

Dónde:

A = (Abs. muestra) – (Abs. blanco muestra)

Documento Derogado

B = (Abs. blanco Adenosina) – (Abs. blanco reactivo)

C = (Abs. patrón) - (Abs. blanco reactivo)

50 = es la concentración del patrón II utilizado. Si se utiliza los patrones I o III, multiplicar por 25 o 75 respectivamente.

Abs = Absorbancia

Cuadro 16. Niveles compatibles con tuberculosis

Líquido	Niveles de compatibilidad
Líquido pleural	Por encima de 32 unidades/litro
Líquido cefalorraquídeo	Por encima de 5 unidades/litro
Líquido pericárdico	Por encima de 96 unidades/litro
Líquido peritoneal	Por encima de 36 unidades/litro
Líquido ascítico	Por encima de 36 unidades/litro

Fuente: Bacteriología del *M. tuberculosis* y de Micobacterias No Tuberculosas. Manual de Procedimientos, Instituto Nacional de Salud. Subdirección de Epidemiología y Laboratorio Nacional de Referencia. Bogota D.C. Mayo de 2001.

Preparación de reactivos

Preparación del Buffer fosfatos (50 milimoles (mM): pH 6.5)

- Pesar el fosfato dibásico de sodio Na_2HPO_4 $12H_2O$ 5.62 gramos.
- Pesar el fosfato ácido de sodio $NaH_2PO_4H_2O$ 4.73 gramos.
- Usar agua desionizada o agua destilada hervida durante 10 minutos.
- Disolver en un balón aforado, una a una, las sales y completar a 1,000 mililitros con agua desionizada.
- Comprobar el pH (pH 6.5).
- Rotular y almacenar de 2 a 8 ºC en frasco ámbar.
- Disolver y aforar.
- Medir el Ph de la solución buffer; si no tiene el 6.5 ajustarlo con gotitas de hidróxido de sodio al 2% o ácido clorhídrico al 1N.

  Es estable por 2 meses

Solución madre de sulfato de amonio (15 Milimoles - mmol)

- Pesar 1,982 gramos de sulfato de amonio $(NH_4)_2SO_4$
- Disuelva en un balón y complete a 1,000 mililitros con el agua desionizada. Depositar en un frasco ámbar y rotular.

  Es estable por 1 año

Solución fenol 106 milimoles, nitroprusiato 0.17 milimoles

Documento Derogado

- Pesar 5 gramos de fenol en cristales.
- Pesar 0.025 gramos de nitroprusiato de sodio.
- Disolver en un balón aforado y complete a 500 mililitros con agua desionizada.
- Rotular y guardar en frasco ámbar, de 2 a 8 °C.
  Es estable por 2 meses.

Solución de hipoclorito alcalino [11 milimoles de hipoclorito de sodio (NaCIO), 125 milimoles de hidróxido de sodio (NaOH)]

- Pesar 2.5 gramos de hidróxido de sodio y agregar 300 mililitros de agua destilada.
- A la preparación anterior agregar 8.2 mililitros de hipoclorito de sodio al 5%, complete a 500 mililitros con agua desionizada y mezclar.
- Guardar en un frasco ámbar a temperatura entre 2 a 8 °C.
  Es estable por 2 meses.

Solución buffer de adenosina (21 Milimoles de adenosina, 50 Milimoles de fosfato, pH 6.5)

- Colocar 5 mililitros de buffer fosfatos 50 milimoles en un tubo de vidrio, agregar 0.056 gramos de adenosina.
- Calentar en baño maría hasta disolver y enfríe inmediatamente en el chorro de agua fría para evitar el desprendimiento de amonio.
- Completar el volumen (10 mililitros) con buffer fosfatos y rotule el tubo.

Nota: Preparar en el momento de usar.

Preparación de patrones para la curva de calibración

Patrón I: Tome 0.25 mililitros de la solución madre de sulfato de amonio y complete a 100 mililitros con buffer fosfatos en balón aforado de 100 mililitros que equivale a 25 unidades por litro.

Patrón II: Tome 0.50 mililitros de la solución madre de sulfato de amonio y complete a 100 mililitros con buffer fosfato en balón aforado de 100 mililitros, que equivale a 50 unidades por litro.

Patrón III: Tome 0.75 mililitros de solución madre de sulfato de amonio y complete a 100 mililitros con buffer fosfatos en balón aforado de 100 mililitros, que equivale a 75 unidades por litro.

Bioseguridad

El personal de laboratorio debe cumplir en todo momento las medidas básicas de bioseguridad para evitar el riesgo de infección, esto se logra mediante la organización en el trabajo, la concentración, el estado de alerta, y la implementación de medidas de precaución muy simples y de poco costo.

Documento Derogado

Es importante recordar que en el momento que se está frente al paciente sintomático respiratorio, es el mayor riesgo de infectarse por aspiración de núcleos de gotas conteniendo BAAR.

Información y control médico del personal de laboratorio.

- Los trabajadores de salud infectados con VIH u otra enfermedad inmunosupresora, con tratamientos prolongados con medicamentos inmunosupresores (como corticoides) o trabajadores con diabetes no deben trabajar en áreas de riesgo.
- Los que padecen enfermedades pulmonares crónicas deben contar con autorización de su médico para ser incorporados a las tareas del laboratorio de tuberculosis.
- Son necesarias las reuniones periódicas con todo el personal de laboratorio, destinadas a recordar las medidas de bioseguridad, analizar si se están cumpliendo con regularidad, dilucidar las causas de los accidentes que pudieran haberse producido y realizar las correcciones que fueran necesarias en la rutina de trabajo.
- Cuando el personal presente síntomas respiratorios por más de quince días, deberá pasar consulta médica, y disponer de exámenes, entre ellos: baciloscopía, radiografía de tórax, prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico y cultivo de muestras pulmonares.
- En cada sección deben estar expuestas las normas básicas de bioseguridad específicas para cada tipo de tarea.
- El personal debe informar a su jefe inmediato cualquier accidente de trabajo.
- Realizar evaluación médica, por lo menos una vez al año, de los trabajadores de salud de las áreas de mayor riesgo de transmisión de *M. tuberculosis* y otras infecciones respiratorias.

Precauciones generales durante el procesamiento de muestras para el diagnóstico de tuberculosis.

- Aplicar todas las medidas lógicas para evitar la generación y movimiento de aerosoles que son el vehículo principal de transmisión de bacilos.
- Manipular el material potencialmente infeccioso en áreas alejadas de la circulación general. Restringir el acceso al laboratorio de personal ajeno al área de trabajo para evitar movimientos, corrientes de aire, distracciones y exposición de personas no involucradas.
- No utilizar ventiladores ni acondicionadores que generen movimientos de aire en el momento de manipulación de material potencialmente infeccioso, mientras se está trabajando.
- Al finalizar la tarea y antes de poner en funcionamiento ventiladores y aires acondicionados, desinfectar las superficies de mesas donde se realizaron los extendidos y

Documento Derogado

donde se colocaron recipientes con material potencialmente infeccioso, se recomienda no permitir el ingreso de personas ajenas a esta actividad durante media hora como mínimo y luego ventilar para eliminar vapores de cloro o fenol.

- No barrer ni limpiar superficies en seco, utilizar siempre un trapeador húmedo. No encerar. No levantar polvo al limpiar.
- No ubicar en el área de trabajo objetos innecesarios (adornos, plantas, floreros y otros) ni sacar registros o elementos allí utilizados.
- Cuando se están procesando muestras utilizar siempre gabacha descartable o gabachón, de manga larga con puño comprimido y cerrada, sobre la gabacha blanca, para proteger de las sustancias químicas, colorantes y salpicaduras accidentales con muestras.
- Utilizar respiradores N-95 o N-100, el cual debe cumplir las normas de la NIOSH. deben ser de uso personal. Pueden ser reutilizados siempre y cuando se conserven en un lugar seco y no adquieran humedad, ni se deformen; para que no se humedezcan no guardarlos dentro de envolturas plásticas. El tiempo de uso se recomienda como máximo una semana, pero sí está en perfecta condición.
- Utilizar guantes descartables para manipular material potencialmente infeccioso, lo mismo para limpiar derrames y manipular desinfectantes.
- Lavarse las manos antes y después del uso de guantes y siempre que sea necesario, no tocar instalaciones, material de escritorio o equipo del laboratorio con los guantes puestos.
- Dentro del área de procesamiento de muestras no se debe: beber, comer, fumar, maquillarse, utilizar uñas acrílicas, introducirse en la boca elementos, utilizar anillos, joyas o bisutería, incluyendo el reloj, celular u otro dispositivo electrónico.

Recomendaciones generales en el área de trabajo.

- El área de trabajo debe mantenerse limpia, ordenada, con suficiente luz (natural o artificial) y buena ventilación.
- En caso de accidente, que se derrame una muestra en el piso o en la mesa de trabajo, colocar hipoclorito de sodio al 0.5% o fenol al 5%, cubrir con papel absorbente y empapar cuidadosamente el papel. Dejarlo durante treinta minutos antes de limpiar el área. Luego descartarlo como material bioinfecciosos.
- Todo material contaminado: láminas portaobjetos, frascos recolectores de muestras, y otros; antes de salir del laboratorio deben recibir tratamiento de decontaminación; descartando el material adecuadamente.
- Ningún equipo de protección personal sustituye el cuidado, orden y precaución que debe tener cada técnico al realizar su trabajo.
- Si se produce una herida cortante o punzante en el momento en que se está manipulando muestras, extendidos, o material descartado, el personal debe lavarse las manos o la zona afectada de inmediato con abundante agua y jabón, aplicando

Documento Derogado

inmediatamente alcohol etílico al 70%. Si el accidente fuese con una muestra positiva se debe consultar con el médico, para determinar si es necesario el uso de quimioprofilaxis.

- Si se produce una salpicadura que afecte el ojo con material potencialmente infeccioso o un reactivo, se debe lavar con agua destilada o solución fisiológica estéril utilizando un recipiente estéril.
- Si se produce contacto con un ácido concentrado, lavar la zona y ropa afectada con abundante agua.
- Comunicar al jefe de laboratorio luego de tomar las medidas descritas y anotar la fecha del accidente, en el formato respectivo.

Limpieza de mesas de trabajo:

Las mesas de laboratorio se deben desinfectar con hipoclorito de sodio al 0.5%, o alcohol al 70%, antes y después de la rutina de trabajo. La desinfección de las mesas debe ser hecha por el personal técnico, no debe dejarse esta tarea al personal de limpieza.

Las diluciones de lejía deben prepararse cada día, ya que éstas liberan cloro en forma gaseosa con lo que se debilita su potencial germicida transcurrido el tiempo, además las soluciones de hipoclorito de sodio son inactivadas en presencia de grandes cantidades de materia orgánica.

Área de preparación de medios de cultivo y reactivos

En esta área se requiere: mesa, balanza, pH-metro, coagulador y refrigerador con capacidad suficiente para almacenar los medios y reactivos que necesitan ser mantenidos a temperatura entre 2 a 8 °C.

Tareas de laboratorio del área de tuberculosis, según el riesgo y pruebas a realizar
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.

Documento Derogado

Cuadro 17. Niveles de precaución, actividades de laboratorio asociadas y evaluación de riesgos en los laboratorios de tuberculosis

★ Nivel de riesgo del laboratorio de tuberculosis	Actividades del laboratorio	Evaluación del riesgo
Bajo riesgo	Recepción de muestras, baciloscopía directa del esputo; preparación de muestras para utilizarlas en un cartucho de prueba automatizada de amplificación de ácidos nucleicos (como la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico)	Bajo riesgo de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; baja concentración de partículas infecciosas
Riesgo moderado	Concentración de muestras para la inoculación en medios de cultivo primarios; antibiograma directo (por ejemplo, ensayos de sonda en línea en esputo tratado)	Riesgo moderado de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; moderada concentración de partículas infecciosas
Alto riesgo (laboratorio de contención de tuberculosis)	Manipulación de cultivos para la identificación; antibiogramas o ensayos de sonda en línea en aislados cultivados, procesamiento de muestras, lectura de cultivos, esterilización y/o desinfección de material potencialmente infeccioso.	Alto riesgo de generación de aerosoles infecciosos a partir de las muestras; alta concentración de partículas infecciosas

Fuente: Equipo técnico. MINSAL, 2019

★El nivel de riesgo se refiere a la probabilidad de que alguna persona del laboratorio sea infectada por *M. tuberculosis* como resultado de los procedimientos realizados en el laboratorio.

Recomendaciones:

- Seleccionar para estas áreas mesas, sillas, armarios, estantes y mobiliario que puedan ser decontaminados con hipoclorito de sodio al 0.5% o alcohol al 70%; este mobiliario debe permanecer en el área, para evitar contaminación.
- 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 la zona de riesgo mediano deben ingresar el material de vidrio reciclado, medios de cultivo y reactivos necesarios para el procesamiento de muestras.
- Debe ser de acceso restringido al personal técnico y administrativo ajenos al área.

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 con ventiladores y extractores de aire.

Documento Derogado

- 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 al 0.5% 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 mobiliario necesario para realizar los procedimientos técnicos.
- Espacio suficiente para ubicar el equipo necesario.
- Aire acondicionado independiente.
- 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 clase II, tipo A2, filtra y retiene a los bacilos que pueden quedar suspendidos en las operaciones de mayor riesgo. 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 aproximadamente 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 ese ducto.
- Las centrífugas de mesa deben estar a una altura cómoda para que pueda verse el rotor y para operar sin dificultad.
- 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.

Área de esterilización de material contaminado

En ella se ubican los autoclaves utilizados para decontaminar: muestras, sobrenadantes que deben ser desechados, y el material de vidrio utilizado (potencialmente) infeccioso que debe ser reciclado (tubos, pipetas, otros); debe reunir las siguientes características:

- 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

Documento Derogado

o 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.

- El material a 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 descartarse 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 que debe estar ubicada en forma contigua a la de esterilización de material.
- En el área de lavado y reciclado de material de vidrio se requiere lavabo y mesas amplias, autoclave y estufa (preferentemente de esterilización). Referirse a *Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis*, 2013. Organización Mundial de la Salud.

Supervisión y control de calidad.

Para supervisar es preciso contar con técnicas operativas estándares. La supervisión implica observación, coordinación, corrección, enseñanza, estímulo y evaluación de la competencia técnica de las actividades del personal que se desempeña en el área de tuberculosis de los laboratorios, con el propósito que el trabajo sea realizado en forma eficiente.

Es un proceso educativo recíproco, permanente, regular y planificado, que permite desarrollar los conocimientos y la capacidad del personal, crear actitudes respecto al trabajo y contribuir a mantener la eficacia de una red de servicios organizados, en este caso, los laboratorios que efectúan técnicas bacteriológicas de tuberculosis.

Métodos de supervisión

a) Procedimientos indirectos

Son aquellos que se efectúan a distancia, basados en algunas de las siguientes modalidades:

- Envío de muestras o láminas de resultado conocido por el nivel supervisor al supervisado, para comparar los resultados.
- Envío de láminas del trabajo habitual desde el nivel local al nivel intermedio o al nivel superior para comparar los resultados y evaluar la aplicación de la técnica baciloscópica. Esta modalidad es la más aceptable desde el punto de vista operacional y constituye la supervisión técnica indirecta.
- Control de calidad externo de los medios de cultivo comparando la sensibilidad de los medios preparados por la red y la del laboratorio nacional de referencia.

Documento Derogado

- Control de calidad externo de la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico, comparando la concordancia, sensibilidad y especificidad de las pruebas realizadas por la red.
- Control de calidad interno de la prueba Adenosin deaminasa con relectura de muestras ya reportadas como positivas.
- El análisis crítico, cuantitativo y cualitativo de la información estadística.

b) Procedimientos directos

Estos procedimientos se basan en la visita facilitadora por funcionarios del nivel superior y regional a los servicios locales, lo que constituye la supervisión técnica y administrativa directa, permitiendo que ésta sea más rápida, efectiva, permitiendo la toman decisiones *in situ*. Sin embargo, desde el punto de vista operacional, resulta difícil de llevar a cabo en forma regular y oportuna; por las limitaciones de tiempo, movilización y factibilidad de cobertura del supervisor.

Control de calidad indirecto de las baciloscopías.

Es un procedimiento que realizan en conjunto los distintos niveles de la red de laboratorios, tiene como objetivo elevar y mantener la calidad de trabajo. No tiene carácter punitivo (aplicación de sanciones) y se basa en la comparación y evaluación técnica indirecta de láminas de baciloscopía preparadas en el día a día correspondiente al trabajo que se realiza en cada laboratorio. Los aspectos a tomar en cuenta en esta evaluación son: el extendido, la coloración, la calidad de la muestra, concordancia cualitativa y cuantitativa de las lecturas microscópicas.

El control de calidad permite:

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

Control de calidad interno

El responsable del área de tuberculosis en el laboratorio debe establecer un sistema de controles regulares y continuos de los puntos críticos. Es un compromiso que se debe asumir en cada laboratorio que realiza bacteriología de la tuberculosis.

El control de calidad interno comprende:

- Evaluación de materiales, equipos y reactivos.

Documento Derogado

- Desempeño del personal.
- Procedimientos estandarizados.
- Informes precisos y oportunos.
- Oferta y aplicación adecuada de los métodos diagnósticos.
- Rendimiento de los métodos diagnósticos para detectar casos.
- Seguimiento de los resultados obtenidos.
- Medidas correctivas a aplicar cuando la imprecisión del resultado excede los límites considerados aceptables o se producen demoras evitables.

Preparación de láminas para el control interno de la coloración

El personal debe cumplir los siguientes procedimientos:

- Preparar extendidos de muestras positivas y negativas, tratadas previamente con 10 gotas de hipoclorito de sodio al 0.5% por lo menos durante media hora. Preparar con ellas tantos extendidos como sean necesarios, para que puedan ser utilizados durante dos meses. Guardarlas en cajas con separaciones, diseñadas para guardar extendidos, o dentro de una caja envueltas en papel suave, bien acondicionadas, en lugar seco.
- Controlar la calidad de la coloración en cada serie de extendidos a colorear, tiñendo una lámina negativa y otra positiva. Registrar el resultado de este control de calidad en la PCT- 4. (anexo 8).
- Comprobar que los BAAR se vean completa e intensamente coloreados con fucsina y que la coloración de fondo sea uniforme, del color esperado y que ofrezca buen contraste.
- Si se detectan defectos, repetir el control con otros extendidos para descartar un posible error en la técnica de tinción. Si persiste el defecto, investigar la causa de error. Si se realizan más de diez baciloscopías por día, se debe repetir el control arriba descrito (coloración de un extendido positivo y uno negativo) una vez por semana.
- Si se realizan menos de diez baciloscopías por día se deben incluir los frotis positivo y negativo como control diariamente.

Control de registros e indicadores de la calidad de trabajo:

- Verificar que las muestras estén siendo procesadas en el día en que fueron recibidas o al día siguiente. Si el laboratorio no puede hacer baciloscopías todos los días o si recibe muestras de centros periféricos, verificar que no transcurran más de cinco días desde que las muestras fueron tomadas hasta que son procesadas e informadas.
- Controlar que los resultados de las baciloscopías se estén entregando regularmente como máximo tres días hábiles después de procesada la muestra.
- Verificar que los resultados sean recibidos por personal responsable del sistema de salud.

Documento Derogado

- Comprobar que hayan sido derivadas para cultivo las muestras que lo requieren, de acuerdo a lo establecido en la normativa.

Analizar y mantener un registro de los siguientes indicadores:

- Concentración de baciloscopía por sintomático respiratorio.
- Positividad de baciloscopía de diagnóstico.
- Número de baciloscopías realizadas por caso.

Si estos valores se alejan significativamente de los habituales, se deben investigar las causas.

- Sucesión de resultados positivos en uno o unos pocos días de trabajo. Si se detectan, investigar si se ha producido contaminación cruzada (transferencia de bacilos desde una muestra altamente positiva a las siguientes)
- En el caso en que detecten anormalidades y no puedan ser identificadas las causas, consultar al laboratorio de referencia.

Supervisión técnica indirecta de la baciloscopía

Consiste en el envío de láminas desde el laboratorio local (supervisado) al laboratorio supervisor (centro de referencia de control de calidad de baciloscopía); se basa en la comparación de resultados y la evaluación de la aplicación de la técnica baciloscópica en las láminas preparadas por los laboratorios en su trabajo de rutina. Los laboratorios de los centros de referencia de control de calidad tendrán bajo su supervisión a la red local y el laboratorio nacional de referencia a los centros de referencia de control de calidad.

Conservación y envío de las láminas.

- Todos los laboratorios que efectúan baciloscopías deben conservar durante un mes la totalidad de las láminas positivas y negativas.
- Para conservar las láminas se debe quitar el aceite de inmersión con papel absorbente. Una vez limpias se debe revisar la numeración o identificación y guardarlas.
- Todas las láminas deben ser enviadas en orden correlativo en los primeros cinco días hábiles del mes siguiente (según calendarización) cumpliendo las indicaciones del instructivo para el llenado del envío de control de calidad indirecto de baciloscopía. (anexo 11).

Evaluación de resultados de supervisión de cada lámina.

Al hacer la supervisión de cada lámina se evaluará:

- Calidad de muestra: mucopurulentas, mucosa o saliva.

Documento Derogado

- Extendido: fino, grueso, homogéneo, no homogéneo y tamaño adecuado. (Ver anexo 12. Calidad de extendido y coloración de láminas)
- Coloración: buena (sin precipitados o cristales de fucsina), buena con objeciones (falta de decoloración y con presencia de cristales de fucsina); deficiente.
- Concordancia de los resultados: especificidad, sensibilidad, concordancia, discordancia

Toda la información generada en la supervisión técnica indirecta debe ser comunicada a los laboratorios supervisados mediante la elaboración de un informe.

Supervisión administrativa indirecta

Consiste en el análisis y la evaluación crítica cuantitativa y cualitativa de la información estadística mensual para poder evaluar:

- Correlación cuantitativa y cualitativa con la información de meses anteriores.
- Proporción de baciloscopías para diagnóstico y para el control del tratamiento.
- Variaciones en la proporción de resultados positivos en las baciloscopías para diagnóstico.
- Relación entre baciloscopías de diagnóstico positivo y casos diagnosticados.
- Correlación entre baciloscopías de control de tratamiento y casos en tratamiento.

Es conveniente, que el equipo del programa de tuberculosis del nivel local, efectúe un análisis global de la información mensual para establecer las relaciones pertinentes entre las diversas actividades: localización de casos, exámenes bacteriológicos, notificación, pacientes en tratamiento, entre otros.

La supervisión es una actividad prioritaria en el PNTYER, a fin de mantener la calidad y eficiencia de la red de laboratorios que efectúan técnicas bacteriológicas de tuberculosis, y es una responsabilidad esencial de todos los niveles de gestión.

Durante la supervisión son requeridos los registros y los resultados de control de calidad interno y externo, por lo que deben estar disponibles.

Control de calidad del cultivo BAAR

El encargado de laboratorio de micobacteriología, es el responsable de establecer y analizar los resultados de los controles internos y de realizar las correcciones necesarias cuando se detectan deficiencias.

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

- Una rutina de trabajo con un sistema de controles regulares y continuos de los puntos críticos.

Documento Derogado

- Evaluar 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.
- Proporcionar el seguimiento de los resultados de los controles de calidad.
- Aplicar las medidas correctivas cuando la imprecisión del resultado excede los límites considerados aceptables o se producen demoras evitables.

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

- Coloración del medio de cultivo: 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.
- Consistencia: 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.
- Textura/homogeneidad: evitar 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.
- Sensibilidad del medio:
  El LNR debe realizar el control de calidad del medio de cultivo de forma interna a todos los lotes de medio preparados en cada establecimiento, con el objetivo de determinar comparativamente la sensibilidad para el cultivo de *M. tuberculosis* de lotes de medio Löwenstein Jensen preparados en el laboratorio.

Existen dos formas en las que se puede llevar a cabo el control de calidad interno de los lotes preparados por los laboratorios de TB.

1. En el LNR, el control se realiza con una cepa pura H37RV del *M. tuberculosis*, de al menos 15 días sembrada.

Preparación de la suspensión bacilar.

- Retirar con una asa bacteriológica estéril el total de colonias del cultivo a procesar y colocar en el frasco estéril con tapa de rosca que contiene las perlas de vidrio.
- Agitar en el vortex durante 2 minutos con el fin de obtener un homogenizado de la cepa a estudiar.
- Adicionar aproximadamente 2 mililitros de agua destilada estéril.

Documento Derogado

- Agitar nuevamente por 30 segundos.
- Dejar reposar 20 minutos sin mover
- En un tubo de 20 x 125 milímetros agregar 1.0 mililitro de agua destilada estéril, con la pipeta de transferencia o con la pipeta de 1 mililitro adicionar 0.5 mililitros de la suspensión bacilar al tubo.
- Agregar gota a gota hasta lograr una turbidez igual a la del tubo de la escala de Mc Farland número 1, para obtener una suspensión de 1mg/ml de masa bacilar.

Preparación de diluciones

- Tomar 6 tubos con 9 mililitros de agua destilada estéril, marcados secuencialmente desde 10-1 hasta 10-6
- Con una pipeta estéril descartable, tomar 1mililitro de la suspensión con turbidez similar al tubo 1 de Mc Farland de la cepa en estudio y agregar al tubo que se identificó como 10-1.
- Mezclar con el agitador por 30 segundos la dilución 10-1, para obtener una suspensión homogénea.
- Con una nueva pipeta estéril descartable, tomar 1 mililitro de la dilución 10-1 y agregar al tubo identificado como 10-2 en la misma forma que antes.
- Mezclar con el agitador por 30 segundos la dilución 10-2, para obtener una suspensión homogénea.
- Continuar así usando cada vez una nueva pipeta, hasta preparar las diluciones 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} y 10^{-6}

Siembra de las diluciones bacilares 10^{-5} y 10^{-6}

- Colocar en cada una de las gradillas los tubos con medio de cultivo en estudio y que corresponden a las diluciones 10^{-5} y 10^{-6}, además de las dos diluciones a sembrar según corresponda.
- Antes de sembrar agitar durante 30 segundos cada una de las diluciones.
- Sembrar 0.2 mililitros (200 µl) en cada tubo de medio de la suspensión 10^{-5} de la serie identificada como 10^{-5}, agregar el inóculo apoyando la pipeta sobre el plano inclinado del medio, luego realice el mismo procedimiento para las series 10^{-6}

Incubación

- Después de sembrar el inoculo realizar el proceso de distribución sobre toda la superficie del medio.
- Tomar cada uno de los tubos por sus extremos con el pulgar y el índice de la misma mano, manteniéndolo en posición horizontal y haciéndolo rotar suavemente para que la suspensión sembrada se distribuya sobre toda la superficie del medio. Este procedimiento es de gran importancia para distribuir el inóculo homogéneamente sobre la superficie del medio, de este modo se obtiene un desarrollo de colonias que facilita el recuento.

Documento Derogado

- Colocar los tubos en una bandeja de acrílico levemente inclinados y llevar a incubar a 37 °C con las tapas sin ajustar.
- Marcar las bandejas con la fecha de siembra y lecturas a los 21 y 35 días, registrando dichas lecturas en el formulario para registro de control de calidad de medios de cultivo.

2. En los laboratorios de la red que preparan medios de cultivo el control de sensibilidad consiste en sembrar regularmente las muestras de esputo para 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).

   Los resultados de control de sensibilidad pueden evaluarse como satisfactorios hasta los veinte días de incubación. Cuando los resultados no sean satisfactorios, 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.

Esterilidad

Observar esterilidad absoluta, después de incubar cuatro tubos de cada nuevo lote al azar, a 37 °C durante cuarenta y ocho horas y luego de dejarlos cuarenta y ocho horas adicionales a temperatura ambiente.

Registro de la preparación, recepción y consumo de medios de cultivo.

Todos los laboratorios de la red que preparan medios de cultivo deben llenar el formulario para mantener un registro actualizado que permita individualizar lotes deficientes y para descartarlos, evaluar la calidad de los mismos y cuantificar el consumo del laboratorio (anexo 13).

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.

Control interno de la calidad de los registros

El responsable del área de tuberculosis de cada laboratorio debe:

- Disponer de un profesional no involucrado en la realización e informe del cultivo, para que revise los datos y resultados consignados en los informes elaborados ese día, los cuales deben coincidir 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 o cinco días de tomadas

Documento Derogado

las muestras.

- Derivar los aislamientos de los pacientes que lo requieran, para identificación y prueba de sensibilidad, de acuerdo a lo establecido en los presentes lineamientos técnicos.
- Garantizar el control de calidad interno de los resultados del cultivo.

Muestra con baciloscopía positiva y con cultivo negativo.

El personal de laboratorio debe investigar:

a) 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.

b) 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.

Al repetirse la contaminación en muestras del mismo paciente, se procederá a utilizar técnicas más enérgicas de decontaminación para investigar muestras sucesivas de ese individuo.

Si persiste la 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, el proceso de decontaminación, se harán las correcciones técnicas en caso de detectarse de acuerdo a la normativa vigente.

Se retroalimentará al técnico o profesional que haya procesado las muestras contaminadas en el caso que se detecte que el problema se asocia a un operador.

Cuando hay un incremento inusual del número o frecuencia de cultivos positivos en un corto periodo de tiempo, se debe investigar la posibilidad de que haya existido

Documento Derogado

contaminación cruzada y por lo tanto falsos resultados positivos de cultivos.

Se debe investigar la posibilidad de que haya existido contaminación cruzada y por lo tanto falsos resultados positivos de cultivos.
Verificar que los pacientes involucrados no tienen clínica compatible con tuberculosis, para 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 descontaminadas, se sospecha que la transferencia fue realizada mediante las soluciones o instrumentos utilizados durante el proceso de decontaminación.

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 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

El Salvador cuenta con una red de laboratorios de tuberculosis establecida y organizada, en la que algunos laboratorios de nivel intermedio también realizan cultivo. En ese sentido el LNR centraliza el control de calidad de los medios elaborados en la red y analiza el aporte del cultivo al diagnóstico de la tuberculosis.

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 de medios de cultivo y reactivos.
- Temperatura de los equipos.

Mediante el análisis de la información registrada, es necesario evaluar:

Documento Derogado

- 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.

Control de calidad de la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico

- Cada cartucho contiene controles internos (control de procesamiento de la muestra y el control de verificación de sonda).
- Los controles positivos y negativos pueden ser procesados de acuerdo con las directrices locales.
- Registrar los resultados de las muestras de control, solucionar los problemas de cualquier resultado inesperado y monitorear tendencias en el tiempo.
- Cepas de control deben ser aislados clínicos bien caracterizados (fenotípica y genotípicamente).
- Monitorear rutinariamente indicadores de calidad.

Monitoreo del indicador de calidad

- El monitoreo rutinario de indicadores de calidad (indicadores de desempeño) es un elemento clave en la garantía de calidad para cualquier prueba de diagnóstico y es también un requisito de ISO.
- Cada laboratorio donde se realiza la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico, debe recopilar y analizar los indicadores de calidad mensualmente.
- Cualquier cambio inexplicable en los indicadores de calidad (como el aumento de las tasas de error, el cambio en la tasa de positividad de MTB o la tasa de resistencia a RIF o cambio significativo en el volumen de pruebas realizadas) debe ser documentado e investigado.
- Las tasas de error superior a un umbral predeterminado (por ejemplo 5%) deben ser investigadas.
- Los indicadores de calidad deben ser revisados por el responsable del área de tuberculosis y el jefe del laboratorio, y siempre deben estar vinculadas a las acciones correctivas si se observan los resultados o tendencias inesperadas.
- Un conjunto de indicadores estándar de calidad se debe utilizar para todos los laboratorios que realizan las pruebas rápidas moleculares mediante amplificación de ácido nucleico.
- Se establecerá un sistema de emisión centralizada de los indicadores de calidad.

Documento Derogado

- La documentación de las acciones correctivas y mejoras posteriores/ normalización de los indicadores de laboratorio después de la adopción de medidas correctivas es importante.

Control interno de ADA

El control interno para adenosin deaminasa se realiza con muestras positivas, las cuales se almacenan en alicuotas congeladas, de valores conocidos.

Las muestras positivas de referencia son utilizadas cada vez que se procesan muestras y curva de calibración.

Sistema de gestión de calidad en tuberculosis

El sistema de calidad se construye fundamentalmente con información documentada.

Los documentos que identifican los procesos, procedimientos, instrucciones, especificaciones y registros son herramientas que tienen la intención de guiar a las personas en la realización de sus tareas, facilitar la toma de decisiones, reproducir las acciones y las pruebas, reducir los errores relacionados con la mala comunicación, reducir las variaciones en los productos y minimizar las fluctuaciones en el desempeño. En su conjunto constituyen una guía que establece claramente las expectativas con respecto al trabajo que se debe realizar.

En vista de lo anterior, el laboratorio de tuberculosis debe contar con:

- Procedimientos operativos estándar (POEs) de las técnicas y procedimientos realizados en la rutina diaria.
- Formularios para el registro de temperaturas de incubadoras y refrigeradoras.
    - Formularios para registro de uso de cabinas de seguridad biológica, prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico, coaguladores para medios de cultivo, microscopios, balanzas, medidores de pH.
- Formularios para registro de elaboración del medio de cultivo.
- Formularios para registro de control de calidad interno de medios de cultivo.
- Equipos identificados con datos de vida del instrumento y etiqueta de riesgo biológico.
- Bitácoras de mantenimientos de equipos.

Este párrafo deberá ir a continuación de Solicitud para determinación de ADA, ya que se complementa con los últimos dos párrafos antes de las disposiciones generales.

Documento Derogado

Sistema de registro

El registro del laboratorio se utiliza para documentar los resultados del examen microscópico de las muestras; también aporta información que integrada a la producida por otros laboratorios, es útil para evaluar la situación epidemiológica.

El laboratorio debe poder investigar en sus registros:

- Sintomáticos respiratorios examinados.
- Muestras recibidas y referidas para baciloscopía, prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico, ADA, cultivo, prueba de sensibilidad y tipificación.
- Resultado de las diferentes pruebas bacteriológicas de cada paciente.
- Casos diagnosticados y controlados.
- Reactivos e insumos recibidos y consumidos.

Los laboratorios de la red deben contar con los siguientes instrumentos estandarizados por el PNTYER:

- Norma nacional de prevención y control de la tuberculosis.
- Lineamientos técnicos para el diagnóstico de la tuberculosis a través de pruebas de laboratorio clínico vigente.
- Libro para el llenado del envío del control de calidad indirecto de baciloscopía.
- Solicitud de examen bacteriológico de tuberculosis (PCT- 3).
- Registro de actividades de laboratorio (PCT- 4).
- Libro de registro de envío de cultivos BAAR (PCT-11).

Los laboratorios que realizan otras pruebas deben de contar con:

- Registro de resultados de la prueba rápida molecular mediante amplificación de ácido nucleico (anexo 14)
- Registro de cultivos de esputo (anexo 15)
- Registro de pruebas de tipificación (anexo 16)
- Solicitud para la determinación de adenosin deaminasa (anexo 17)

Los registros deben ser conservados por lo menos durante cinco años.

La precisión en la documentación es crítica para analizar resultados, evaluar y planificar apropiadamente las actividades.

El personal de salud al llenar los instrumentos de registro debe cumplir lo establecido en los instrumentos técnicos jurídicos del Programa de control de Tuberculosis, estar completos y contener información confiable y consistente.

Documento Derogado

VI. Disposiciones generales

a) Obligatoriedad

Es responsabilidad del personal técnico y administrativo que labora en las RIIS del Sistema Nacional de Salud, dar cumplimiento a los presentes Lineamientos técnicos, caso contrario se aplicarán las sanciones establecidas en la legislación administrativa respectiva.

b) De lo no previsto

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

c) Derogatoria

Déjase sin efecto los *Lineamientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis por microscopia directa,* primera edición año 2016. y *Lineamientos técnicos para el cultivo BAAR,* primera edición, 2016.

d) Anexos

Forman parte de los presentes lineamientos los siguientes anexos:

Anexo 1. Preparación de bicarbonato.
Anexo 2. Solicitud de examen bacteriológico de tuberculosis (PCT-3).
Anexo 3. Motivo para rechazo de muestras.
Anexo 4. Triple embalaje para transporte de muestras.
Anexo 5. Registro envío de cultivos BAAR (PCT-11).
Anexo 6. Microscopio.
Anexo 7. Preparación de reactivos.
Anexo 8. Registro de actividades de laboratorio (PCT-4).
Anexo 9. Características de colonias contaminantes.
Anexo 10. Hoja de referencia de cepas.
Anexo 11. Envío de control de calidad indirecto de baciloscopía.
Anexo 12. Calidad de extendido y coloración de láminas.
Anexo 13. Control de calidad y consumo de medios de cultivo.
Anexo 14. Registro de resultados de prueba Xpert MTB/RIF.
Anexo 15. Registro de cultivos de esputo.
Anexo 16. Registro de pruebas de tipificación.
Anexo 17. Solicitud de para la determinación de adenosin deaminasa (ADA).

VII. Vigencia:

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

Documento Derogado

San Salvador, a los quince días del mes de octubre de dos mil diecinueve.

Dra. Ana del Carmen Orellana Bendek
Ministra de Salud

Documento Derogado

VIII. Abreviaturas y siglas

ADA: Adenosin deaminasa.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BAAR: Bacilo ácido alcohol resistente.

BK: Baciloscopía.

CSB: Cabina de seguridad biológica.

LNR: Laboratorio nacional de referencia.

MDR: Multidrogorresistente.

M-40: Primera muestra del sintomático respiratorio.

M-41: Baciloscopía de control de tratamiento.

M-42: Baciloscopías sub - secuentes.

OPS: Organización Panamericana para la Salud.

PCR: Cadena de polimerasa en tiempo real.

PNTYER: Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias.

PSD: Prueba de sensibilidad a drogas.

RPM: Revoluciones por minuto

RR: Resistencia a rifampicina.

SNS: Sistema nacional de salud.

SR: Sintomático respiratorio.

TB: Tuberculosis.

TB-MDR: Tuberculosis multidrogorresistente.

UCSF: Unidad comunitaria de salud familiar.

V.E: Valor esperado.

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

Documento Derogado

IX. Bibliografía

- Ministerio de Salud. Programa Nacional de Tuberculosis. Lineamientos técnicos para el diagnóstico bacteriológico por microscopía directa. 1ra. Edición, El Salvador, C.A. 2016
- Ministerio de Salud. Programa Nacional de Tuberculosis. Normas Técnica para la Prevención y Control de la Tuberculosis. 3da. Edición, El Salvador, C.A. enero 2018.
- Ministerio de Salud. Programa Nacional de Tuberculosis. Manual de Control de Calidad de la Red de Laboratorios de Tuberculosis, El Salvador 2004.
- Organismo Andino de Salud - Convenio Hipólito Unanue. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte 1: Manual de actualización de la baciloscopía. Programa "Fortalecimiento de la red de laboratorios de tuberculosis en la región de las Américas".Lima: ORAS – CONHU, 2da. edición junio 2018.
- Organización Panamericana de la Salud. Normas y Guía Técnica, Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 2 cultivo, 2008.
- Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Parte 1 Manual de actualización de la Baciloscopía/Programa "Fortalecimiento de la Red de Laboratorios de Tuberculosis en la Región de las Américas"-Lima: ORAS – CONHU; 2018.
- Ministerio de Salud. Guía para el manejo de la tuberculosis resistente, El Salvador, junio 2011.
- Organización Panamericana de la Salud, Manual de bioseguridad en el laboratorio de tuberculosis, 2013
- Ministerio de Salud. Lineamientos técnicos sobre bioseguridad, El Salvador, enero 2012.
- Ministerio de Salud. Lineamientos técnicos para la prevención y control de la tuberculosis, El Salvador, 2da. edición, septiembre 2015.
- Organismo salvadoreño de normalización, Buenas prácticas de laboratorio clínico. Especificaciones. NSO 11.68.01:11 xxx El Salvadoreño
- Ministerio de Salud. Manual de toma, manejo y envío de muestras de laboratorio, 1ra. Edición, octubre 2013. El Salvador.

Documento Derogado

- Ministerio de Salud. Manual de procedimientos de bioseguridad para los laboratorios clínicos, diciembre 2008. El Salvador.
- Ministerio de Salud. Guía de bioseguridad para los laboratorios clínicos, octubre 2008. El Salvador.
- OSN. Norma técnica para el manejo de los desechos bioinfecciosos. NSO 13.25.02:07. El Salvador.
- Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica (OSARTEC), Reglamento técnico salvadoreño 11.01.01:13, de Buenas Practicas de Laboratorio Clínico, Especificaciones, El Salvador.
- Ministerio de Salud. Guía para la atención pediátrica de la tuberculosis y la coinfección TB/VIH, septiembre 2017. El Salvador.
- Ministerio de Salud. Lineamiento técnico para la realización de cultivo BAAR, 1ra. Edición, abril 2014, El Salvador.
- Gene Xpert Dx System. Manual del operador, versión 4.0 de software, Cepheid. 2010.
- Trabajo original, Estandarización de la técnica de adenosin deaminasa, un aspecto crítico en la ayuda diagnóstica para TB, Marlen Cristina Valencia, *et al*
- Adenosin deaminasa (ADA) en el diagnóstico de tuberculosis pleural, departamento de microbiología y medicina del hospital nacional Cayetano Heredia, Universidad peruana Cayetano Heredia.
- Adenosin deaminasa como nuevo marcador para el diagnóstico de tuberculosis pleural, Universidad de Sonora, Alejandra Grajeda García.
- Instituto Nacional de Salud, subdirección de epidemiología y laboratorio nacional de referencia, laboratorio de micobacterias. Bacteriología del Mycobacterium tuberculosis y de micobacterias no tuberculosis, Manual de procedimientos. Bogotá, D.C., mayo del 2001.

Documento Derogado

X. Anexos

Documento Derogado

Anexo 1. Preparación de bicarbonato de sodio al 10%.

- **Pesar 10 gramos de bicarbonato de sodio.**
- **Colocarlo en un frasco volumétrico de 100 mililitros.**
- **Disolver el bicarbonato con agua destilada, aforando hasta la marca.**
- **Proceder a esterilizar en autoclave y guardar en refrigeración en frasco limpio.**

Documento Derogado

Anexo 2. Solicitud de examen bacteriológico de tuberculosis (PCT-3)

MINISTERIO DE SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE TUBERCULOSIS Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
SOLICITUD DE EXAMEN BACTERIOLÓGICO DE TUBERCULOSIS (PCT-3)
Fecha edición, julio 2018

Establecimiento: _____ **Fecha y hora de recepción de la muestra en el laboratorio:** _____
Nombre: _____ **Nº de Exp.**_____ **Edad:** _____
Procedencia: Consulta Ext. _____ **Emergencia** _____ **Hospitalización** _____ **Otro** _____
Sexo: M ____ **F** ____ **Grupo de riesgo y vulnerabilidad*:** _____
Dirección Exacta: _____ **Tel:**_____
Municipio: _____ **Depto:** _____ **Área: U** _____ **R** _____
Tipo de muestra: ESPUTO _____**OTRA** _____ **Especificar**_____
Fecha de indicación: _____**Caso nuevo sensible**_____, **retratamiento sensible**_____, **drogorresistente**_____

*Grupos de riesgo y vulnerabilidad: Personas con Diabetes ◇, EPOC ◇, Hipertensión ◇, Insuficiencia Renal Crónica (IRC) ◇, VIH ◇, inmunosuprimido ◇; trabajador de salud ◇, privado de libertad ◇, paciente con TB-RR o MDR ◇, contacto de TB-MDR ◇, adulto mayor ◇, indigente ◇, alcohólico ◇, drogodependiente ◇, migrante ◇, otros ◇.

EXAMEN SOLICITADO

BK PARA DIAGNÓSTICO EN S. R.
1ra. ☐ 2da. ☐

CULTIVO PARA DIAGNÓSTICO:
1. Alta sospecha de TB y 2 BK (-) ☐
2. Sospecha de tuberculosis infantil ☐
3. Sospecha de TB extrapulmonar ☐
4. Persona con VIH y con sospecha de TB ☐
10. BK con 1 a 9 bacilos en 100 campos ☐
14. Paciente con diabetes ☐

PRUEBA XPERT MTB/RIF
Motivo de indicación:
1. S.R. con 2 BK(-) y con TB presuntiva ☐
2. Persona con VIH ☐
3. Privado de libertad, o antecedente* ☐
4. S. R con diabetes ☐
5. S. R con inmunodeficiencias ☐
6. Caso TB que no negativiza al 2°, 4° o inicio del 5to. mes de tratamiento ☐
7. Retratamientos (recaídas, fracasos, pérdida en el seguimiento) ☐
8. Sospecha de TB extrapulmonar ☐
9. Contacto de caso TB/MDR ☐
10. Niños ☐
11. Personal de salud ☐
12. Otros (especificar): _____ ☐
13. Indicación por resultado previo ☐

CULTIVO MÁS TIPIFICACIÓN Y SENSIBILIDAD:
5.1 Fracaso ☐
5.2 Pérdida en el seguimiento ☐
5.3 Recaída ☐
6. Contacto de caso TB-MDR ☐
7. Antecedente o estancia actual en Centro Penitenciario* ☐
8. Coinfección TB/VIH ☐
9. No negativiza al 2°, 4° o inicio del 5to. mes de trat. ☐
11. Migrante nacional o extranjero ☐
12. Paciente con tto. Antituberculoso que no mejora clínicamente, aunque sus BK de control sean neg. ☐
13. Caso crónico de tuberculosis ☐
15. Caso RR o MDR ☐

BACTERIOLOGÍA CONTROL DE TRATAMIENTO
BACILOSCOPÍA: 1ra. ☐ 2da. ☐
CULTIVO: ☐
MES DE TTO: 2° ◇ 3° ◇ 4° ◇ 5° ◇ 6° ◇ 7° ◇ 8° ◇ 9° ◇ 10° ◇ 11° ◇ 12° ◇ Otro ◇

DROGAS: H ◇ R ◇ Z ◇ E ◇ S ◇ Kn ◇ Lv ◇ Et ◇ Cs ◇ Mox ◇ Pto ◇ Cfz ◇

Observaciones_____

*En el motivo de indicación privado de libertad o antecedente, por favor subrayar si está en centro penitenciario o tiene antecedente de haber sido privado de libertad. Tanto en la indicación de gene xpert como de cultivo.
Nota: Si el paciente tiene más de un motivo de indicación para la prueba bacteriológica, checarlas todas.
No olvide que el informe de los resultados de cultivo se dará a los 30, 45 o 60 días y nunca antes.
El establecimiento de salud que indica la prueba deberá retirar la respuesta

Nombre y firma del solicitante: _____ **Sello**

Documento Derogado

RESULTADO EN EL LABORATORIO

PRUEBAS BACTERIOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE CASOS DE TUBERCULOSIS

1. Baciloscopia:

1ra. muestra Positivo: ☐ Negativo: ☐ Nº. de bacilos observados en 100 campos: ☐

2da. muestra Positivo: ☐ Negativo: ☐ Nº. de bacilos observados en 100 campos: ☐

2. Prueba XPERT MTB/RIF: Negativo: ☐ Inválido: ☐ Error: ☐

MTB sensible a Rif. ☐ MTB resistente a Rif. ☐ MTB sensibilidad indeterminada ☐

Observaciones: _____

3. Cultivo: Positivo: ☐ Negativo: ☐ Contaminado: ☐

4. Resultado de tipificación: _____

_____

5. Resultado de sensibilidad: _____

_____

Observaciones: _____

_____

_____

Nombre de la persona responsable del resultado y sello: _____

Fecha de resultado: _____

Documento Derogado

Anexo 3. Motivo de rechazo de muestras

Motivo de rechazo de muestras	
Muestra mal rotulada	Nombre y/o apellido no coincide
	Identificación de muestra ilegible
Muestra sin rotular	No tenga nombre ni apellido
Solicitud ilegible	Datos en formulario ilegibles
Solicitud incompleta	Llenado incompleto de formulario PCT-3 Especialmente: Fecha y hora de recibido en el laboratorio, Motivo de solicitud de examen
Muestra inadecuada	Muestra no corresponde a la prueba indicada
Muestra derramada	Parte o la totalidad de la muestra se haya derramado fuera de su contenedor primario
Muestra no cumple la condición de transporte	Cuando no cumpla las condiciones de triple embalaje y cadena de frío

Fuente: Sección de Tuberculosis – Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Documento Derogado

Anexo 4. Triple embalaje

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis. Ministerio de Salud

1. Envase primario: contiene la muestra

2. Envase secundario: contiene el frasco con la muestra

3. Envase terciario: contiene el envase secundario

4. Cadena de frío: termo con paquetes refrigerantes en el cual se ubica el envase terciario.

Documento derogado

GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

Anexo 5. Libro de registro de envío de cultivos BAAR (PCT-11)

MINISTERIO DE SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE TUBERCULOSIS Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
LIBRO DE REGISTRO DE ENVIO DE CULTIVOS BAAR (PCT- 11)

REGIÓN: _____ **SIBASI:** _____

ESTABLECIMIENTO DE SALUD: _____ **AÑO:** _____

PROFESIONAL RESPONSABLE: _____

Nº (1)	Nombre del paciente (2)	Edad (3)	Dirección completa del paciente (4)	*Motivo de Indicación de Gene Xpert MTB/RIF (5)	**Motivo de indicación de cultivo (6)	Fecha de envío a laboratorio de referencia (7)	Nombre del laboratorio al cual se envía (8)	Nombre de quien recibe en el laboratorio de referencia (9)	Fecha de recepción de resultado (10)	Nombre de la persona que recibe los resultados (11)	Resultado (12)		Resultado de sensibilidad (13)
											Gene Xpert	Cultivo	

* **Motivo de indicación de Gene Xpert MTB/RIF:** 1. S.R. con 2 BK (-) y con TB presuntiva, 2. Persona con VIH, 3. Privados de libertad o anteceedente, 4. S. R con diabetes, 5. S. R con inmunodeficiencias, 6. Caso TB que no negativiza al 2° o 4° mes de tto., 7. Retratamientos (recaída, fracaso, pérdida en el seguimiento, 8. Sospecha de TB extrapulmonar, 9. Contacto de caso TB-MDR, 10. Niños, 11. Personal de salud. 12. Otros (especificar). indicación por resultado previo.

** **Motivo de indicación** de cultivo: **1-** Alta sospecha de TB y 2 BK negativas, **2-** Tuberculosis infantil, **3-** Tuberculosis extrapulmonar, **4-** VIH con sospecha de TB, **5.1-** Fracaso, **5.2-** Pérdida en el seguimiento, **5.3-** Recaída, **6-** Contacto de caso TB-MDR, **7-** Antecedente o estancia actual en centro penitenciario, **8-** Coinfección TB/VIH, **9-** No negativa al 2° o 4° mes de tratamiento, **10-** BK con 1 a 9 bacilos en 100 campos, **11-** Migrante nacional o extranjero, **12-** Paciente con tratamiento antituberculoso que no mejora clínicamente, aunque sus BK de control sean negativas, **13-** Caso crónico de tuberculosis y **14-** Paciente con diabetes, **15.** Caso RR o MDR. Cuando el cultivo es para control de tratamiento, anotar "control de tto." **Y si es: caso nuevo, retratamiento o drogorresistente.** NOTA: **Cuando un laboratorio refiera cepas para confirmación**, registrar en columna (6) las referencias **de ellas.**

MINISTERIO DE SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE TUBERCULOSIS Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
INSTRUCTIVO PARA EL LLENADO DEL LIBRO DE REGISTRO DE ENVIO DE CULTIVOS BAAR (PCT- 11)

El presente libro de registro de envío de cultivos BAAR (PCT - 11), es un instrumento de información oficial del Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias de El Salvador, el cual debe ser adecuadamente llenado y conservado.

En este libro debe registrarse el envío y resultados de todos los cultivos BAAR, pruebas Xpert MTB/RIF, confirmación de cepas, que se envían a los laboratorios de referencia.

Separar la información cada mes y totalizarlo para hacer el consolidado trimestral.

REGIÓN:
Anotar el nombre de la región a la que pertenece el establecimiento.

SIBASI:
Anotar el nombre del SIBASI correspondiente

ESTABLECIMIENTO DE SALUD:
Anotar el nombre del establecimiento de salud responsable de la información

AÑO:
Anotar el año durante el cual se está realizando el registro

PROFESIONAL RESPONSABLE:
Anotar el nombre del profesional responsable del llenado del libro. (En establecimientos con laboratorio serán los profesionales de laboratorio los encargados del llenado de las columnas correspondientes al envío; en los establecimientos sin laboratorio será responsabilidad del médico o enfermera encargados del programa).

1. No.
Ubicar el número que le corresponde al paciente, según orden correlativo

2. NOMBRE DEL PACIENTE:
Escriba con letra legible los nombres y apellidos completos del paciente, para facilitar su seguimiento. (Pueden tomarse más de una línea para escribir el nombre completo)

3. EDAD:
Anotar la edad del paciente en años.

4. DIRECCIÓN COMPLETA DEL PACIENTE:
Anotar la dirección de procedencia del paciente, en forma completa para facilitar el seguimiento de éste.

5. INDICACIÓN DE GENE XPERT MTB/RIF: Checar si la muestra que se envía es para realizar prueba Gene Xpert MTB/RIF y anotar motivo de indicación, según PCT - 3.

6. MOTIVO DE INDICACIÓN DEL CULTIVO:
En esta columna anotar el motivo por el cual ha sido indicado el cultivo (ver indicaciones en la parte de abajo de la matriz)

7. FECHA DE ENVÍO AL LABORATORIO DE REFERENCIA:
Anotar el día, mes y año en que fue enviada la muestra al laboratorio correspondiente, según red establecida y conocida por todos.

8. NOMBRE DEL LABORATORIO AL CUAL SE ENVIA:
Anotar el nombre del laboratorio de referencia al cual se envía la muestra. (Ej. Laboratorio Nacional de Referencia, laboratorio Hospital de San Miguel, otro)

9. NOMBRE DE QUIEN RECIBE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO:
La persona que recibe la muestra debe anotar su nombre completo.

10. FECHA DE RECEPCIÓN DE RESULTADO:
Anotar la fecha exacta en que el establecimiento recibe el resultado del cultivo BAAR o de la prueba Xpert MTB/RIF o confirmación de crecimiento de cepa.

11. NOMBRE DE LA PERSONA QUE RECIBE LOS RESULTADOS:
Anotar el nombre completo de la persona que recibió los resultados de la prueba.

12. RESULTADO:
Anotar el resultado de la prueba Xpert MTB/RIF, ésta puede ser: Negativo, Indeterminado, Error, MTB sensible a Rif., MTB resistente a Rif., MTB indeterminada y/o registrar el resultado del cultivo (positivo, negativo, contaminado, micobacteriosis, otros)

13. RESULTADO DE SENSIBILIDAD:
Anotar el resultado de sensibilidad, si existiera en el reporte.

NOTA: Siempre que se envié muestra para cultivo BAAR, prueba Gene Xpert MTB/RIF o referencia de cepas, llevar la PCT – 11 para que se registre el nombre de la persona que recibe la muestra (columna 9) y siempre que se retiren los resultados del cultivo, también llevar este libro para anotar la fecha (columna 10) y nombre de la persona que recibe los resultados (columna 11). Estas dos columnas deberán ser llenadas por una persona que trabaje en el laboratorio donde se realizan las pruebas diagnósticas.

Documento Derogado

Anexo 6. Microscopio

Es el instrumento fundamental en el trabajo de microscopia directa del laboratorio.
Su función principal es magnificar los objetos dentro del campo microscópico a un tamaño que pueda ser visto por el ojo humano.
El microscopio que se utiliza en el laboratorio para el examen microscópico de las baciloscopías, es el microscopio compuesto de campo claro.

El microscopio de campo claro, consta de parte mecánica y óptica.

. Parte mecánica:

Base o soporte del microscopio, platina, carro mecánico, tornillo macrométrico, tornillo micrométrico, brazo.

. Parte óptica:

Oculares, objetivos, condensador, fuente de luz, prismas (dentro del tubo binocular.)

Fuente: Programa Nacional de Tuberculosis. Ministerio de Salud

Uso correcto 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.
- Colocar adecuadamente el portaobjetos en la platina.
- Girar los tornillos de ajuste lentamente hasta que la imagen se vea clara.

Documento Derogado

- Al utilizar el objetivo 100x bajarlo lentamente hasta que entre en contacto con el aceite de inmersión, girar el tornillo micrométrico de ajuste fino para enfocar.

Cuidados

- Verificar su buen estado óptico y mecánico.
- Colocar una cubierta plástica o de tela preferentemente para protegerlo del polvo.
- No debe estar ubicado en un sitio donde existan vibraciones o esté expuesto a sustancias químicas o corrosivas.
- Evitar que los objetivos de uso seco y la platina entren 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 lente o algodón con alcohol al 70%.
- Al término de cada jornada de trabajo, se debe limpiar cuidadosamente, en especial el objetivo de inmersión y dejarlo con papel lente o algodón; para eliminar el exceso de aceite.
- Al cambiar el microscopio de lugar, se debe tomar del brazo para no arrastrarlo, evitando daños posteriores.
- Cada microscopio debe ser manipulado cuidadosamente y dar el mantenimiento indicado; de observar algún defecto, debe someterlo a revisión por el técnico competente.

El poder de resolución del microscopio dependerá de su buen uso y mantenimiento.

Documento Derogado

Anexo 7. Preparación de reactivos

1) Fucsina fenicada 3%.

- Tres gramos de fucsina básica.
- Cien mililitros de alcohol de 95°.
- 55 mililitros de fenol acuoso.*

Se agita y se agrega agua destilada hasta completar un litro, se deja reposar veinticuatro horas y se filtra.

(*) Fenol acuoso: 100 gramos de fenol cristalizado y 10 mililitros de agua destilada, se calienta en baño de María hasta completa disolución, luego se enfría.

2) Azul de metileno 1%.

- 1 gramos de azul de metileno.
- 100 mililitros de alcohol de 95°.
- Se disuelve por agitación y se agrega agua destilada hasta completar un litro. Se deja reposar veinticuatro horas y se filtra.

3) Solución decolorante

 mililitros de ácido clorhídrico para análisis.

970 mililitros de alcohol de 95°.

Con una pipeta: Se deja escurrir por las paredes el ácido clorhídrico en el matraz que contiene el alcohol, luego se agita nuevamente.

Cada vez que los colorantes se utilizan deben filtrarse previamente.

Conservación

Los colorantes deben conservarse en frascos de color ámbar por un tiempo no mayor de un mes.

Documento Derogado

Anexo 8. Registro de actividades de laboratorio (PCT-4)

Ministerio de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Registro de actividades de laboratorio (PCT- 4)

Región: _____ **SIBASI:** _____

Establecimiento de salud: _____ **Mes:** _____ **Año:** _____

Laboratorista encargado del programa: _____

N°	Fecha de recep. en laboratorio	Fecha de procesa miento	Procedencia	Nombres y apellidos	Edad	Sexo		Número correlativo		Baciloscopía diagnóstica		BK de control de tratamiento										Tipo de muestra	Observaciones
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)		(8)		(9)	(10)	(11)		(12)		(13)		(14)		(15)		(16)	(17)
						M	F	1ra	2da	1ra.	2da.	2do.		4to.		6to.		9no.		Otro			

Ministerio de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Instructivo para el llenado del registro de actividades de laboratorio (PCT - 4)

a) El presente libro de registro de actividades de laboratorio (PCT-4), es un instrumento de información oficial del Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias de El Salvador, el cual debe ser adecuadamente llenado y conservado.

b) Se considera Sintomático Respiratorio investigado a la persona mayor de 10 años que presenta tos con expectoración por 15 días o más de evolución, que es captado en la consulta externa, emergencia, hospitalización, centros penales, por proveedores no PNT o en la comunidad y se le ha examinado al menos una muestra de esputo.

c) En este libro deben registrarse todos los sintomáticos respiratorios investigados por el laboratorio.

d) Separar la información cada mes y totalizarlo para hacer los consolidados mensuales y trimestrales.

Región: Anotar el nombre de la región a la que pertenece el establecimiento.

SIBASI: Anotar el nombre correspondiente.

Establecimiento de salud: Anotar el nombre del establecimiento de salud correspondiente.

Laboratorista encargado/a del programa: Anotar el nombre del laboratorista responsable del llenado del libro.

1) **N°:** Anotar el número correlativo de los pacientes.

2) **Fecha de recepción en laboratorio:** Anotar con números la fecha en que se recibe la muestra en el laboratorio.

3) **Fecha de procesamiento:** Registrar la fecha en que se procesó la muestra.

4) **Procedencia:** Anotar la dirección exacta de la residencia del paciente, en forma completa, para facilitar el seguimiento, si éste resulta ser caso positivo de TB.
En caso que las muestras sean referidas de otro establecimiento escribir el nombre del establecimiento de donde proceden.

5) **Nombres y apellidos:** Escriba con letra legible y de manera completa los nombres y apellidos del paciente, tal como aparece en PCT-3, para facilitar su seguimiento.

6) **Edad:** Anotar la edad del paciente en años.

7) **Sexo:** Marcar con una X el sexo correspondiente.

8) **Número correlativo:** Anotar los números en forma correlativa, de acuerdo al orden de entrega de la muestra del paciente. No se deben repetir los números ni utilizar letras.
Recordar que para diagnóstico son dos baciloscopías y para control de tratamiento son dos baciloscopías por paciente (en cada control) y cada una tiene que llevar un número diferente.
Iniciar con el número 1 el registro de baciloscopías de cada mes, siguiéndolo en correlativo hasta el final del mes.

Los números correlativos no deben ser necesariamente consecutivos para un mismo paciente. Ejemplo:

José Antonio Pérez Gómez	1	5
Juana Luisa Beltrán García	2	3

9 y 10) **Baciloscopia diagnostica:** Anotar el resultado de las muestras con color rojo, si es positivo, y el número de cruces (+) (++) (+++), si se observa de 1 a 9 bacilos, registrar el número de bacilos observados ej. 2b, 5b; si el resultado es negativo escribir "N" con cualquier color de lapicero en la casilla según corresponda (1ra. o 2da.) muestra.

11, 12, 13, 14 y 15) **Baciloscopias de control de tratamiento:** Anotar el resultado de baciloscopías de control de tratamiento de casos (al 2do., 4to., 6to., 9no. u otro mes de tratamiento), con color rojo si es positivo y el número de cruces, o registrar el número de bacilos observados de 1 a 9 bacilos; si es negativo escribir una "N" con cualquier otro color de lapicero, en la casilla correspondiente. Cuando sea retratamiento anotarlo en observaciones.

16) **Tipo de muestra:** Esputo (es la muestra dada de forma espontánea por el paciente).

17) **Observaciones:** Registrar la calidad de muestra que se ha procesado o cualquier otra información que se considere importante.

Documento Derogado

Anexo 9. Características de colonias contaminantes

Las colonias contaminantes pueden presentar las siguientes características: pigmentadas, cremosas, lisas.

Fuente: Sección de tuberculosis – Laboratorio Nacional de Salud Pública.

Documento Descargado

GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

Anexo 10. Hoja de referencia de cepas para prueba de sensibilidad y tipificación. Versión 2018

Establecimiento que envía: _____

Teléfono de laboratorio: _____

Nombre del paciente: _____

Registro: _____ Edad: _____ VIH: _____

Tipo de muestra: _____ Fecha de envío: _____

Número de cultivo: _____ Medio utilizado: LJ ☐ OK ☐

Motivos de indicación:

Fracaso	
Pérdida en el seguimiento	
Recaída	
Contacto de caso TB-MDR	
Antecedente o estancia actual en centro penitenciario	
Coinfección TB/VIH	
No negativiza al 2do. o 4to. mes de tratamiento	
Migrante nacional o extranjero	
Paciente con tto. que no mejora clínicamente, aunque sus BK de control sean negativas	
Caso crónico de tuberculosis	
Caso RR o MDR	
Otros	

Nota: queda a criterio de la sección de tuberculosis del LNR, realizar la prueba de sensibilidad a cepas de muestras extrapulmonares.

Todos los campos son de llenado obligatorio

Resultado de cultivo: _____

Resultado de BK: _____

Fecha de siembra: _____ Fecha de crecimiento: _____

Cepa de crecimiento: lento ☐ rápido ☐

Responsables: _____

_____

Documento Derogado

GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

Documento Derogado

Anexo 11. Envío de control de calidad indirecto de baciloscopías

Ministerio de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Instructivo para el envío del control de calidad indirecto de baciloscopia

Región: _____SIBASI: _____
Establecimiento: _____
Mes de envío: _____ Fecha de envío: _____
Total de láminas enviadas: _____
Total de láminas negativas enviadas: _____
Total de láminas positivas enviadas: _____
Total de SR de diagnóstico examinados: _____ Total de SR de diagnóstico con BK (+): _____
Total de pacientes en control de tto. examinados: _____Total de pacientes en control de tto. con BK (+): _____

n° de cada lámina positiva	Resultado por cruces	Baciloscopía diagnóstica SR		Baciloscopía control de tratamiento					Observaciones
		1ra.	2da.	2do	4to	6to	9no	Otra	

Nombre del profesional que preparó el envío para el control de calidad:
_____

Vo.- Bo. del jefe de laboratorio: _____

Sello:

Ministerio de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Instructivo para el envío del control de calidad indirecto de baciloscopia

Región: anotar el nombre de la región a la que corresponde el establecimiento de salud

SIBASI: registrar el nombre del SIBASI correspondiente.
Establecimiento: escribir el nombre del establecimiento de donde se está enviando el control de calidad.
Mes de envío: anotar el mes en que fueron vistas las láminas en el nivel local.
Fecha de envío: registrar la fecha en que se está enviando el control de calidad; ejemplo si se están enviando las láminas vistas en el establecimiento de salud durante el mes de enero, la fecha del mes de envío estará entre los primeros cinco días del mes de febrero.

Total de láminas enviadas: anotar en números absolutos el total de láminas que están enviando a control de calidad; ejemplo: si el establecimiento de salud procesó 300 baciloscopías en un mes determinado, el total de láminas enviadas será 300.

Total de láminas negativas enviadas: en número absoluto registrar el total de láminas que el establecimiento de salud ha reportado como negativas en su PCT-4; ejemplo si de 300 baciloscopías procesadas, el establecimiento de salud reporto 250 negativas, este será el número absoluto registrado en total de láminas negativas enviadas (250).

Total de láminas positivas enviadas: en número absoluto registrar el total de láminas que el establecimiento de salud a reportado como positivas (incluye de 1 a 9 bacilos) en su PCT-4; ejemplo, si el establecimiento de salud de 300 baciloscopías procesadas, reporto 50 positivas, este será el número absoluto registrado en total de láminas positivas enviadas (50).

Total de S.R de diagnóstico examinados: Colocar el número de S.R de diagnóstico examinados en el laboratorio.

Total de S.R con BK (+): colocar el número de S.R examinados en el laboratorio con al menos una BK (+).

Total de pacientes en control de tratamiento examinados: colocar el número de pacientes en tratamiento examinados en el laboratorio.

Total de pacientes en control de tratamiento con BK (+): colocar el número de pacientes en tratamiento examinados en el laboratorio con al menos una BK (+).

N° de cada lámina positiva: registrar los números correlativos de láminas vista como positivas y reportadas en la PCT-4 como tal; ejemplo la baciloscopía 3, 15, 35, 45, 46, 150, fueron reportadas como positivas, éstas son las que se reportarán en esta columna.

Resultado por cruces: registrar el número de cruces correspondientes a cada lámina positiva +, ++, +++ (en color rojo) o el número de bacilos observados (1 a 9 b.)

Baciloscopía diagnóstica SR: con una "x" marcar si la lámina positiva corresponde a la primera (1ra.) o segunda (2da.) del S.R.

Baciloscopía control de tratamiento: con una "x" marcar si la lámina positiva corresponde al 2do, 4to, 6to, 9no u otro mes de tratamiento.

Observaciones: anotar cualquier cosa relevante, por ejemplo paciente con VIH, nombre del paciente, o cualquier otro aspecto que le sea de utilidad al responsable del centro de referencia de control de calidad.

Nombre del profesional que preparó el envío para el control de calidad: anotar el nombre de la persona de laboratorio que preparó el envío para el control de calidad.

Vo. Bo. del Jefe de laboratorio: anotar el nombre del jefe de laboratorio, que revisó el envío para el control de calidad.

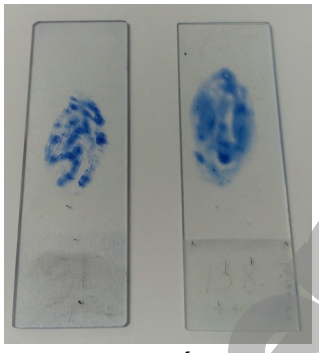
Sello: colocar el sello del laboratorio que está enviando el control de calidad de baciloscopía.

Documento Derogado

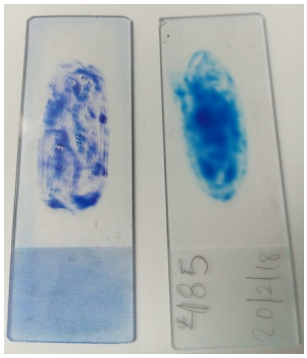
Anexo 12. Calidad del extendido y coloración de láminas

Fino

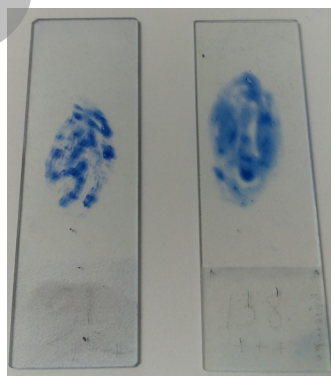
Grueso



Homogéneo



No homogéneo



Tamaño adecuado

Fuente: Sección de micobacterias – Laboratorio Nacional de Referecia. Minsal

Documento Derogado

Anexo 13. Control de calidad y consumo de medios de cultivo

Nº de lote	Tubos preparados	PH	Fechas			Control de esterilidad	Control de Sensibilidad				
			Elaboración o recepción	Se comenzó a utilizar	Se terminó	Se detectó desarrollo	Cepa muestra sembrada	Desarrollo a 20 días (colonias)		Desarrollo a 60 días (colonias)	
								Lote referente	Lote preparado	Lote referente	Lote preparado

Fuente: Sección de tuberculosis – Laboratorio Nacional de Referenca. Ministerio de Salud.

Documento Derogado

GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

Anexo 14. Registro de resultados de prueba Xpert MTB/RIF

Ministerio de Salud

Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Laboratorio Nacional de Referencia - Sección de Tuberculosis

REGISTRO DE RESULTADOS DE PRUEBA XPERT MTB/RIF

Región: _____ SIBASI: _____

Establecimiento de salud: _____ Mes: _____ Año: _____

N° de pruebas realizadas	Fecha de recepción en lab.	Fecha de procesamiento	Fecha resultado	Días promedio	Nombre del paciente	DUI	Edad	Sexo		VIH	Tipo de muestra	* Motivo de indicación	Segundo motivo de indicación	Establecimiento	Municipio	Número correlativo de muestra	Resultado prueba Xpert	Cuantificación de resultado	Sonda mutada en RR	Observaciones
								M	F											
1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

* **Motivo de Indicación de Prueba Xpert MTB/RIF:** 1. S.R. con 2 BK (-) y con TB presuntiva, 2. Pacientes con VIH, 3. Privado de libertad o antecedente, 4. S. R con diabetes, 5. S. R con inmunodeficiencias, 6. Caso TB que no negativizan al 2°, 4° o inicio del 5° mes de tratamiento, 7. Retratamientos (recaída, fracaso, pérdida en el seguimiento), 8. Sospecha de TB extrapulmonar, 9. Contacto de caso TB/MDR, 10. Niños, 11. Personal de salud, 12. Otros (especificar), 13. Indicación por resultado previo.

Ministerio de Salud

Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias

Laboratorio Nacional de Referencia – Sección Tuberculosis

Instructivo para el registro de resultados de prueba Xpert MTB/RIF

Región: Colocar el nombre de la región a la que pertenece el laboratorio que procesa la prueba Xpert MTB/RIF.

SIBASI: Colocar el nombre del SIBASI al que pertenece el laboratorio que procesa la prueba Xpert MTB/RIF.

Establecimiento de Salud: Colocar el nombre del establecimiento de salud al que pertenece el laboratorio que procesa la prueba Xpert MTB/RIF.

Mes: Colocar el mes al que corresponden las pruebas Xpert MTB/RIF.

Año: Colocar el año al que corresponden las pruebas de Xpert MTB/RIF.

1. N° de pruebas realizadas: Escribir el número de las pruebas iniciando de 1 en enero y finalizando en diciembre de cada año.

2. Fecha de recepción en laboratorio: Anotar la fecha en que se recibe la muestra en el laboratorio. Utilizar el formado DD/MM/AAAA.

3. Fecha de procesamiento: Registrar la fecha en que es procesada la muestra.

4. Fecha de resultado: Anotar la fecha en que se obtiene el resultado de la muestra.

5. Días promedio: Anotar el tiempo (en días) que transcurre desde que se recibe la muestra hasta que se obtiene el resultado.

6. Nombre del paciente: Anotar el nombre completo del paciente, sin abreviaturas.

7. DUI: Registrar el número del Documento Único de Identidad.

8. Edad: Anotar la edad del paciente.

9. Sexo: Checar en la casilla correspondiente, según corresponda, el sexo del paciente.

10. VIH: Anotar "R" si el paciente es reactivo, "NR" si es no reactivo y "ND" si se desconoce la información.

11. Tipo de muestra: Escribir si la muestra recibida corresponde a esputo, líquido pleural, de aspirado gástrico, otros.

12. Motivo de indicación: Colocar el número que corresponde al motivo de indicación de la prueba, de acuerdo a los motivos descritos abajo de la matriz; en el caso del motivo 12 "Otros", en columna de observaciones especificar el motivo por el cual se ha indicado la prueba.

13. Segundo motivo de indicación: Registrar un segundo motivo de indicación de la prueba, si lo hubiere.

14. Establecimiento: Escribir el nombre del establecimiento de salud que está solicitando la prueba. Colocar iniciales HN, UCSF, CP, ISSS, UM antes del nombre del establecimiento, Ej.: HN Santa Ana, UCSF Barrios, CP Quezaltepeque.

15. Municipio: Anotar el municipio al que pertenece el establecimiento de salud que solicita la prueba.

16. Número correlativo de muestra: Anotar el número en forma correlativa, de acuerdo al orden que ha establecido el laboratorio.

17. Resultado prueba Xpert: Registrar el resultado obtenido de la prueba Xpert (negativo, MTB detectado resistente a rifampicina, MTB detectado sensible a rifampicina, MTB detectado resistencia indeterminada, número de error, PCR inactivado.

18. Cuantificación de resultado: Se clasificará la reacción por el número de ciclos términos (CT) requeridos para alcanzar el resultado positivo y la cantidad de ADN en la muestra: alta menos de 16 ciclos, medio de 16 a 22 ciclos, baja de 23 a 28 ciclos, muy baja más de 28 ciclos

19. Sonda mutada en RR: Registrar la o las sondas que presentaron la mutación, en el caso de ser resistente. Ej.: sonda A, B, C, D o E.

20. Observaciones: Anotar cualquier información, del paciente, que se considere importante y necesaria.

Documento Derogado

Documento Derogado

GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

Anexo 15. Registro de cultivos de esputo

Ministerio de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Laboratorio Nacional de Referencia - Sección de Tuberculosis

REGISTRO DE CULTIVOS DE ESPUTO

Laboratorio de cultivo: _____ Nombre del profesional responsable: _____

Mes: _____ Año: _____

N° correlativo	Fecha de recepción nivel local	Fecha recepción LNR	Fecha recepción TB	Medio de cultivo	Fecha procesamiento	Establecimiento	Nombre del paciente	DUI	Edad	Tipo de muestra	Sexo		Motivo de indicación	Resultado de BK	Resultado cultivo	Tubos contaminados	Fecha resultado cultivo	Tipificación	Calidad de muestra	Observaciones
											M	F								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		13	14	15	16	17	18	19	20

Motivo de indicación de cultivo: 1- Alta sospecha de TB y 2 BK negativas, 3- Tuberculosis infantil, 3- Tuberculosis extrapulmonar, 4- VIH con sospecha de TB, 5.1- Fracaso, 5.2- Pérdida en el seguimiento, 5.3- Recaída, 6- Contacto de caso TB/MDR, 7- Antecedente o estancia actual en centro penitenciario, 8- Confirmación TB/VIH, 9- No negativiza al 2°, 4° o inicio del 5° mes de tratamiento, 10- BK con 1 a 9 bacilos en 100 campos, 11- Migrante nacional o extranjero, 12- Paciente con tratamiento antituberculoso que no mejora clínicamente, aunque sus BK de control sean negativos, 13- Caso crónico de tuberculosis y 14- Paciente con diabetes, 15- Caso RR o MDR.

Ministerio de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Laboratorio Nacional de Referencia – Sección de Tuberculosis

Instructivo para el Registro de cultivos de esputo

El presente libro de Registro de cultivos de esputo, es un instrumento de información oficial del Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias de El Salvador, el cual debe ser adecuadamente llenado y conservado.

En este libro deben registrarse los resultados de todos los cultivos de esputo que se reciben en los laboratorios de referencia.

Laboratorio de cultivo: Anotar el nombre del establecimiento de salud al que pertenece el laboratorio de referencia de cultivos.

Profesional responsable: Anotar el nombre del profesional responsable del llenado del libro.

Mes: Anotar el mes durante el cual se están recibiendo las muestras para cultivo.

Año: Anotar el año durante el cual se está realizando el registro.

1. **N° Correlativo:** Anotar el número correlativo de las muestras de 1 a finito durante el año.
2. **Fecha de recepción nivel local:** Anotar la fecha en que la muestra fue recibida en el laboratorio de nivel local. Colocar fechas utilizando el formato DD/MM/AA
3. **Fecha de recepción LNR:** Registrar la fecha en que la muestra es recibida en el Laboratorio Nacional de Referencia.
4. **Fecha recepción TB:** Anotar la fecha en que la muestra es recibida en la sección de tuberculosis.
5. **Medio de cultivo:** Anotar el método que se utiliza para realizar el cultivo (Löwenstein - Jensen, Ogawa Kudoh)
6. **Fecha procesamiento:** Registrar la fecha en la que es procesada la muestra
7. **Establecimiento:** Anotar el nombre del establecimiento de donde procede la muestra para cultivo, colocar iniciales HN, UCSF, CP, ISSS, UM antes del nombre del establecimiento, Ej.: HN Santa Ana, UCSF Barrios.
8. **Nombre del paciente**: Anotar el nombre y apellidos completos del paciente (sin abreviar) a quien pertenece la muestra para cultivo.
9. **DUI:** Registrar el número de Documento Único de Identidad del paciente
10. **Edad:** Anotar la edad del paciente en años completos.
11. **Tipo de muestra:** Registrar el tipo de muestra a la que se le procesará el cultivo.
12. **Sexo:** Marcar con una X, según corresponda, el sexo del paciente.
13. **Motivo de indicación:** Colocar el número que corresponde al motivo de indicación del cultivo, según PCT – 3.
14. **Resultado de BK:** Anotar el resultado de la BK que corresponde a la muestra que se utilizó para el cultivo (+, ++, +++, 5baar)
15. **Resultado cultivo:** Anotar el resultado del cultivo (+, ++, +++, 11 colonias).
16. **Tubos contaminados:** Registrar el número de tubos contaminados.
17. **Fecha resultado cultivo:** Anotar la fecha en que se obtienen los resultados del cultivo
18. **Tipificación:** Registrar el resultado de la tipificación.
19. **Calidad de muestra:** Registrar la calidad de la muestra (saliva, mucosa, mucopurulenta, sanguinolenta).
20. **Observaciones:** Anotar toda la información que se considere necesaria.

GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

Anexo 16. Registro de pruebas de tipificación

MINISTERIO DE SALUD
LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA
SECCIÓN DE TUBERCULOSIS

REGISTRO DE TIPIFICACIONES

FECHA DE RECEPCIÓN LNR:	FECHA INGRESO TB:	FECHA DE INGRESO TIPIFICACIÓN:

N° CEPA	CRITERIO DE INGRESO	NOMBRE DE PACIENTE	VIH	ESTABLECIMIENTO	EXPEDIENTE	EDAD	DIRECCIÓN	N° CORELATIVO

TIPIFICACION:	RESPONSABLE:
FECHA DE IDENTIFICACION:	CRECIMIENTO:
OBSERVACIONES:	CONTROL H37 Rv: FECHA:
	PRUEBA: LOTE:

FECHA DE RECEPCION LNR:	FECHA INGRESO TB:	FECHA DE INGRESO TIPIFICACION:

N° CEPA	CRITERIO DE INGRESO	NOMBRE DE PACIENTE	VIH	ESTABLECIMIENTO	EXPEDIENTE	EDAD	DIRECCIÓN	N° CORELATIVO

TIPIFICACION:	RESPONSABLE:
FECHA DE IDENTIFICACION:	CRECIMIENTO:
OBSERVACIONES:	CONTROL H37 Rv: FECHA:
	PRUEBA: LOTE:

Documento Derogado

GOBIERNO DE EL SALVADOR

MINISTERIO DE SALUD

Anexo 17. Solicitud para la determinación de adenosin deaminasa (ADA).

MINISTERIO DE SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE TUBERCULOSIS Y ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
SOLICITUD PARA LA DETERMINACIÓN DE ADENOSIN DEAMINASA (ADA)
COMO APOYO DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS
ADA/002

Diagnóstico: _____ Servicio: _____

1) Fecha de toma de muestra_____/_____/20_____

2) Fecha de recepción de muestra en laboratorio de referencia: _____/_____20_____

3) Nombre completo del paciente: _____

4) Nº de exp: _____ 5) Edad: _____6) Sexo: F M

(Establecimiento que refiere)

7) Domicilio del paciente: _____

8) Institución o establecimiento de salud que solicita la determinación: _____

9) Nombre del solicitante: _____

10) Región: _____ 11) SIBASI: _____

12) Tipo de muestra: a) Líquido pleural ☐ b) Líquido cefalorraquídeo ☐

c) Líquido pericárdico ☐ e) Líquido peritoneal ☐

Nº de muestra: 1°_____ 2°_____3°_____ (si se indica 2° ó 3° muestras explicar porque)_____

_____

13) Resultados de Baciloscopía Directa (BKD) (de líquidos especiales arriba descritos):

a) Positiva ☐ b) Negativa ☐ c) No se realizó ☐ d) Pendiente resultado ☐

14) Resultado de estudio de Biopsia: a) No se tomó ☐ b) Pendiente resultado ☐

Reporte microscópico y conclusión diagnóstica de resultado de biopsia: _____

_____

15) Resultado de cultivo BAAR de líquido: a) Positivo ☐ b) Negativo ☐ c) Pendiente resultado ☐

d) No se realizó ☐ Observación: _____

16) Resultado de cultivo BAAR de macerado de tejido: a) Positivo ☐ b) Negativo ☐

c) Pendiente resultado ☐ d) No se realizó ☐ Observación: _____

17) Valor de ADA: _____u/l Valores de referencia: Líquido pleural_____ u/l

LCR_____ u/l

Liquido pericárdico _____ u/l

Liquido peritoneal _____ u/l

Otro_____ u/l

18) Resumen aspectos relevantes:

_____

_____ _____

Sello y firma de solicitante Sello y firma de quien realiza la determinación

Fecha de realización: _____

Ministerio de Salud
Programa Nacional de Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias
Instructivo de llenado de solicitud para la determinación de adenosin deaminasa (ada).
ada/002

Diagnóstico: Anotar el diagnóstico presuntivo del paciente.

Servicio: anotar el nombre del servicio que solicita el examen.

1) Anotar la fecha en que se ha tomado la muestra.

2) Registrar la fecha de recepción de la muestra en el laboratorio de referencia.

3) Se pondrán de manera entendible los dos nombres y dos apellidos del paciente

4) Colocar el número de expediente del paciente

5 Escribir la edad del paciente.

6) Marcar con una "X" el sexo correspondiente.

7) Registrar el domicilio del paciente de forma completa.

Documento Derogado

8) Colocar el nombre de la institución o establecimiento de salud de donde se solicita la determinación.
9) Anotar el nombre del médico solicitante
10) Se llenará con el nombre de la Región a la que corresponde el establecimiento de salud, si procede, caso contrario dejar en blanco.
11) Anotar el SIBASI al que corresponde el establecimiento, si procede, caso contrario dejar en blanco.
12) Marcar con una "X" en la casilla correspondiente, según el tipo de muestra enviada para la determinación.
13) Registrar el ítem correspondiente al resultado de la BKD del líquido enviado para la determinación.
14) Marcar con una "X" según corresponda, o llenar con el reporte del resultado de biopsia.
15) Marcar con una "X" el resultado correspondiente o la observación necesaria.
16) Marcar con una "X" el resultado correspondiente o la observación necesaria.
17) Anotar el valor correspondiente del ADA según lo realizado y su valor de referencia,
18) Registrar aspectos relevantes considerados que podrían orientar sobre algunos resultados.
NOTA: el original enviarlo al laboratorio de referencia y la copia ubicarla en el expediente del paciente.

Documento Derogado