

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUÍMICA**

**ELABORAR UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS
PARA REALIZAR EL EXÁMEN DE BACILOSCOPIA DONDE
SE INCLUYAN NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD,
PARA LA APLICACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO DEL
HOSPITAL JUAN XXIII.**

ELABORADO POR:

Univ. TITO ZABALA PATTY WILMA GLADYS

Ttrabajo dirigido para optar el título de licenciatura en Bioquímica

**LAPAZ – BOLIVIA
2012**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA BIOQUÍMICA**

**ELABORAR UN MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS
PARA REALIZAR EL EXÁMEN DE BACILOSCOPIA DONDE
SE INCLUYAN NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD,
PARA LA APLICACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO DEL
HOSPITAL JUAN XXIII.**

ELABORADO POR:

Univ. Tito Zabala Patty Wilma Gladys

ASESORAS:

*Dra. María Teresa Álvarez A.
Dra. Liceth Mamani Martínez*

**LAPAZ – BOLIVIA
2012**

GRATITUD Y DEDICATORIA

Doy gracias a Dios por el privilegio que se me dio a compilar este manual.

Dedico este esfuerzo a mis Padres, Hermanos y Primos.

Mi deseo personal es que a través de este manual se pueda llegar a una mejor comprensión e interpretación.

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud personal hacia quienes me ayudaron y me apoyaron a elaborar este manual por el constante apoyo e inspiración que me brindaron.

Quiero expresar mis agradecimientos a: Dra. Teresa Álvarez,
Dra. Liceth Mamani,

RESUMEN

El presente trabajo dirigido tuvo por finalidad la elaboración de un manual donde van incluidos normas generales de bioseguridad preparación del paciente, toma de muestra, técnicas para el diagnóstico de la baciloscopia. Dirigido para el área laboratorio del Hospital Juan XXIII en el presente año debido a que el laboratorio de dicha institución carecía de un manual dirigido para el diagnóstico, el mismo constituyéndose en un instrumento necesario. En el cual se encuentran detallados los pasos a seguir en la toma de muestra, técnicas y procedimientos.

Este trabajo se basó en la investigación y recolección documental de diferentes libros, manuales, revistas, e información del internet.

El manual incluye parámetros necesarios de Bioseguridad y controles de calidad.

Con la bioseguridad se involucraran procedimientos necesarios para preservar la integridad física del personal de laboratorio, hospitalario y de las personas que visiten los diferentes ambientes del mismo, paralelamente contribuir en la protección del paciente y finalmente a la comunidad en general, frente a los agentes etiológicos que provocan la enfermedad.

El manual que se elaboró para el Hospital Juan XXIII es un documento que contribuye a la adquisición de normas y una cultura de comportamiento dentro del ambiente laboratorial.

TABLA DE CONTENIDO

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	3
3.- MARCO TEÓRICO	7
3.1 PRINCIPIOS BÁSICOS DE BIOSEGURIDAD.....	8
3.1.1.- CONTENCIÓN.....	8
3.2.- CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES BIOLÓGICOS POR GRUPO DE RIESGO .	9
3.2.1.- AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO I.....	9
3.2.2.- AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO II	9
3.2.3.- AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO III.....	9
3.2.4.- AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO IV	10
3.3.- CLASIFICACIÓN DE NIVELES DE BIOSEGURIDAD	11
3.3.1.- NIVEL DE BIOSEGURIDAD I.....	11
3.3.2.- NIVEL DE BIOSEGURIDAD II	12
3.3.3.-NIVEL DE BIOSEGURIDAD III.....	12
3.3.4.- NIVEL DE BIOSEGURIDAD IV	12
3.4.- NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO..	12
3.5.- BARRERAS DE PROTECCION	14
3.6.- PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE TUBERCULOSIS	15
3.7.- CULTIVO DE LAS MICOBACTERIAS	17
3.7.1.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN.....	18
3.7.2.- NUEVOS MÉTODOS DE CULTIVO.....	19
3.7.2.1-MÉTODOS RADIOMÉTRICOS.....	19
3.7.3.-LAS PRUEBAS RÁPIDAS Y DIRECTAS.....	20
3.7.3.1.- SONDAS GENÉTICAS^{40, 50,51}	20
3.7.4.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	22
4.- MARCO REFERENCIAL.....	26
5.- JUSTIFICACIÓN.....	27

6.-OBJETIVOS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	28
8.- RESULTADOS	28



1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad la tuberculosis es considerada una de las enfermedades reemergentes más importantes en el mundo como problema de salud pública, agravada por la epidemia de VIH y por el aumento de la fármaco resistencia. Según estimaciones disponibles, aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada por el *Mycobacterium tuberculosis*.¹

La tuberculosis es una enfermedad crónica, infecciosa y curable, causada por el *Mycobacterium tuberculosis* en el 95% de los casos y por *M. bovis* y *M. africanum* ocasionalmente. La tuberculosis pulmonar es la forma más común de la enfermedad, se presenta en más del 80% de los casos y es la principal forma infecciosa.

La transmisión del bacilo se produce casi exclusivamente de persona a persona por vía aerógena.¹

El *M. tuberculosis* es un bacilo aeróbico estricto en forma de bastón que mide de 2 a 6 mm de largo por 0.3 a 0.6 mm de ancho. Se reproduce en forma binaria en 18 a 24 horas, por lo que en cultivo crece lentamente (28 a 30 días). Su principal característica es el alto contenido de lípidos de su pared celular (que representa del 20 al 40% de su peso seco) y le confiere la cualidad de ser ácido-alcohol resistente.

En la mayor parte del mundo, el examen microscópico directo de BAAR es utilizada para la detección de bacilos ácido alcohol-resistentes es la herramienta primaria para el diagnóstico y el control de tuberculosis.



La baciloscopía directa de muestras pulmonares, realizada mediante la técnica de Ziehl Neelsen, es efectiva para detectar los casos de Tuberculosis, evaluar la respuesta al tratamiento y para monitorear las tasas de curación.²

Es importante el análisis de laboratorio del *M. tuberculosis* por tratarse de una bacteria peligrosa del grupo de riesgo 3 para los operadores que realizan el diagnóstico de este agente lo que implica que se deben aplicar medidas estrictas de bioseguridad.

Las normas de seguridad biológica (bioseguridad) son herramientas probadamente eficaces para evitar la contaminación accidental con microorganismos patógenos contenidos en las muestras, así como los riesgos relacionados con la exposición a agentes químicos, físicos y/o mecánicos a los que está expuesto el personal en los laboratorios.³

Este manual de bioseguridad y de procedimientos técnicos para realizar el examen de baciloscopia, para el laboratorio clínico nivel II del Hospital Juan XXIII es un documento que contribuye a la adquisición de normas y a una cultura de comportamiento dentro del ambiente laboral por parte del personal del laboratorio y reducir al mínimo los riesgos de la infección, paralelamente contribuir en la protección del paciente y personal.

El compromiso riguroso, para el cumplimiento de todas las normas establecidas en este manual, permitirá al laboratorio clínico del Hospital Juan XXIII acceder a constantes acreditaciones.



2.- ANTECEDENTES

Durante siglos, la tuberculosis ha plagado países en todo el mundo pero en 1940. Los primeros tratamientos se desarrollaron con medicamentos (Rifampicina, Etambutol, Isoniacida) y gradualmente el índice de la tuberculosis disminuyó, particularmente en países desarrollados donde estos medicamentos estuvieron disponibles ampliamente.

El problema es que está de regreso nuevamente. De acuerdo con Centro para el control de Enfermedades (Centers for Disease and Prevention CDC), existen aproximadamente 14,000 casos en los Estados Unidos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que, en el 2011, 1.6 millones de muertes en todo el mundo se relacionaron con la tuberculosis.⁴

Bolivia es el tercer país con más enfermos de tuberculosis en Sudamérica. Por los altos índices de una enfermedad que se puede prevenir y curar, el país se encuentra bajo observación por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En 2010 se registraron en el país 8.533 casos diagnosticados, de los cuales 7.860 son nuevos y 673 de re tratamiento de la enfermedad. Se calcula que la población enferma con tuberculosis es de 10.000 habitantes.

La mayor cantidad de enfermos con tuberculosis en el país se diagnosticó en los departamentos de Santa Cruz, La Paz, y Cochabamba. En el resto de los departamentos la población no sobrepasa los 400 casos.⁵

La responsable del Programa Nacional de Control de Tuberculosis, Lourdes Carrasco, explicó que 5.571 del total de los afectados corresponden a personas con patologías de



tuberculosis pulmonar positiva contagiosa. El enfermo transmite el mal cuando expulsa al aire gérmenes (bacilos tuberculosos) al toser, estornudar o escupir. Carrasco aseguró que la enfermedad es curable si las personas concluyen el tratamiento; pero si la gente asiste de forma tardía a los establecimientos de salud e interrumpe el tratamiento, las consecuencias son fatales. “Si una persona con tuberculosis no está en tratamiento se muere, pero antes de morir tiene la capacidad de contagiar a 10 personas al año; de ellas dos desarrollan la enfermedad”, explicó. Otra de las preocupaciones de las autoridades se genera en los drogo resistentes, término con el que se califica a las personas resistentes a los medicamentos que se administran durante el primer esquema de tratamiento (que dura seis meses), con medicamentos como la Isoniacida, Rifampicina, Etambutol, Pirazinamida y la Estreptomicina. Los drogo resistentes tienen resistencia principalmente a dos medicamentos: la Rifampicina y la Isoniacida, que son precisamente los más potentes para la cura de la enfermedad. Los pacientes llegan a rechazar la cura y al abandonar el tratamiento de primera línea adquieren resistencia, y para empezar un nuevo tratamiento requieren de dos años con otros medicamentos que incluyen inyectables. Desde 2004 a 2010 se diagnosticaron 257 pacientes drogo resistentes en todo el país de Bolivia; sólo 102 iniciaron tratamiento, el resto aún no fue captado por los centros de salud. La tasa de abandono y las transferencias desconocidas muestran que los establecimientos de salud aún tienen dificultad en lograr la adherencia al tratamiento y seguimiento de los pacientes una vez diagnosticados.⁵ “Si en el esquema del tratamiento cada paciente con tuberculosis le cuesta 200 bolivianos



al Estado, en el caso de los drogo resistentes se requieren 32 mil bolivianos para el tratamiento de cada paciente, y muchos de ellos rechazan la cura porque los medicamentos son muy fuertes y provocan reacciones gástricas, hepáticas y dérmicas, entre otras”, explicó.

Además, la persona diagnosticada como drogo resistente pasa por una serie de complicaciones antes del inicio del tratamiento, porque debe someterse a una serie de exámenes previos de laboratorio como las de función hepática, embarazo, hemograma completo, glucosa, urea, creatinina, audiometría de base, entre otros. Esto para verificar que el paciente se encuentra en buenas condiciones al iniciar un nuevo tratamiento.⁵

Por los altos índices de una enfermedad que se puede prevenir y curar, el país de Bolivia se encuentra bajo observación por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En cuanto al tema de bioseguridad en el trabajo de laboratorios de diagnóstico.

Durante muchos años se trabajó en los laboratorios sin preocuparse por el contacto con material biológico, aun en áreas donde este tipo de material es el objeto del estudio y se realizan actividades que implican la propagación de los agentes de riesgo biológico.

En la década de los 80, con la aparición del virus HIV, surgen el primer Manual de Bioseguridad del Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los EE.UU. el desarrollo de Normas de Bioseguridad y el concepto de las Precauciones Universales, el cual establece que no se deben tratar todas las muestras por igual.

Si bien existía, y aún existe, un sub registro de las LAIs, (*infecciones adquiridas en el laboratorio*), el hecho de que se produjeran motivó a los propios investigadores, por



manipular elevadas concentraciones de los mismos, a requerir la confección de equipos de contención.¹⁰

Por otra parte, se deben tener en cuenta, por recomendaciones de la OMS y por normas internacionales, el seguimiento de las mismas en cuanto a Bioseguridad en los laboratorios de Tuberculosis.

Las normas de bioseguridad a seguirse deben ser absolutas, de aplicación universal, comprometidas con los principios de la ética y tener como fin la protección del ser humano y su entorno.

La norma Boliviana de Bioseguridad para laboratorios clínicos, de alimentos, investigación, enseñanza y producción, especifica requisitos para establecer y mantener un ambiente de trabajo que minimice los riesgos para el personal que trabaja en ellos.⁷

El conocimiento de esta normativa es de carácter obligatorio por el personal de Laboratorio de baciloscopia: se tienen las Normas Técnicas Bolivianas NB 69001 – 69009 y su respectivo reglamento.⁷

Con respecto a los pacientes de Hospital Juan XXIII podemos mencionar que el 10% del total de pacientes que acudieron al centro Hospitalario durante el primer semestre del año 2011 con un diagnóstico presuntivo de tuberculosis fueron confirmados como positivos.⁸



3.- MARCO TÉORICO

En los siglos XVII y XVIII la Tuberculosis fue responsable de una cuarta parte de todas las muertes en adultos. (La palabra tuberculosis ha sido uno de los grandes "tabúes" en la historia de la cultura occidental).

El médico inglés Benjamín Martenl, en su obra A New Theory of The Comsumption fue el primero en aventurar que la causa de la tuberculosis podría ser una "diminuta criatura viviente", una vez en el organismo, podría generar los signos y síntomas de la enfermedad. Fue Robert Koch, en 1882, al utilizar una nueva técnica de tinción, el primero que por fin pudo ver al "enemigo oculto". En el año 1895 Wilhelm Konrad von Rontgen descubre la radiación que lleva su nombre, con lo que la evolución de la enfermedad podía ser observada. Con el conocimiento del agente causante y el mecanismo de transmisión proliferó la aparición de los famosos sanatorios, con los que se buscaba, por un lado, aislar a los enfermos de la población general interrumpiendo la cadena de transmisión de la enfermedad, y por otro, ayudar al proceso de curación con la buena alimentación y el reposo. Pero no fue hasta 1944, en plena II Guerra Mundial, con la demostración de la eficacia de la Estreptomicina, cuando comienza la era moderna de la tuberculosis, en la que el curso de la enfermedad podía ser cambiado. En el año 1952 tiene lugar el desarrollo de un agente mucho más eficaz: la Isoniacida. Ello hace que la tuberculosis se convierta en una enfermedad curable en la mayoría de los casos.

La Rifampicina, en la década de los 60, hizo que los regímenes terapéuticos se acortaran de una forma significativa. Se produjo un descenso progresivo de casos hasta mediados de los



80, en los que la irrupción del VIH, la inmigración desde países en los que la enfermedad es muy prevalente, la formación de bolsas de pobreza y situaciones de hacinamiento, junto con la escasez de recursos sanitarios, han hecho de la Tuberculosis un problema creciente, con la adquisición y propagación epidémica de nuevos casos.⁹

La infección por VIH es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la tuberculosis, siendo 100 veces mayor el riesgo en los coinfectados por ambos microorganismos que en las personas infectadas por tuberculosis que son VIH negativas.

De esta manera es que se han establecido principios básicos de bioseguridad para los laboratorios donde se realizan los exámenes de baciloscopias.

3.1.-PRINCIPIOS BÁSICOS DE BIOSEGURIDAD

La bioseguridad se define como un conjunto de medidas preventivas básicas que tienen como objetivo de proteger la salud humana y ambiental.

Para ello definiremos el término: contención

3.1.1.-CONTENCIÓN

Se utiliza para describir métodos seguros para manejar materiales infecciosos en el medio ambiente de laboratorio donde son manipulados o conservados. El objetivo de la contención es reducir o eliminar la exposición de quienes trabajan en laboratorios, de otras personas y del medio ambiente externo a agentes potencialmente peligrosos.



Medidas de contención el elemento más importante de la contención es el cumplimiento estricto de las prácticas y técnicas microbiológicas estándares de procesamiento de las muestras de laboratorio.

3.2.-CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES BIOLÓGICOS POR GRUPO DE RIESGO

3.2.1.-AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO I

Es poco probable que cause una enfermedad en el hombre sano, no se le conoce factores de virulencia y puede tener susceptibilidad conocida y estable a los antimicrobianos. Ejemplo: *E. coli* K12, *Saccharomyces cerevisiae*, microorganismos que se utilizan en la industria de la alimentación.

3.2.2.- AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO II

Puede causar una enfermedad en el hombre y que es un peligro para los trabajadores, siendo poco probable que se propague a la colectividad, existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz. Algunos de estos agentes pertenecen a la flora habitual del hombre, siendo capaces de originar una patología infecciosa de gravedad moderada o limitada. Ejemplo: *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella* sp., entre otros.

3.2.3.-AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO III

Puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los trabajadores, con riesgo de que se propague a la colectividad y existiendo frente a él generalmente profilaxis o tratamiento eficaz. Implican patología grave, de difícil y largo tratamiento, que se pueden curar con secuelas y ocasionalmente producir la muerte. El mayor y más frecuente peligro que entrañan éstos es la infección adquirida a través de



aerosoles y por fluídos biológicos. Ejemplo: *M. tuberculosis*, *Brucellasp.*, *Coxiellaburneti*, entre otros.

3.2.4.- AGENTE BIOLÓGICO DEL GRUPO IV

Es aquél que causando una enfermedad grave en el hombre y supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista generalmente frente a él profilaxis o tratamiento eficaz. Normalmente son microorganismos de dosis infectiva baja y alta contagiosidad. Ejemplo: Arenavirus como el que produce la fiebre de Lassa, *Machupo*, *Ebola*, *Hantavirus*, etc.

Por esta razón es que se consideran cuatro niveles de contención o de seguridad biológica, se presentan en la tabla N°1, que consisten en la combinación, en menor o mayor grado, de los elementos de seguridad biológica.^{6,10,20}



Tabla N°1 NIVELES DE BIOSEGURIDAD

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICA LABORATORIOS	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Nivel 1 Básico	Enseñanza básica investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Nivel 2 Básico	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA; EPPs, señalización de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2 más ropa especial. Acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención Máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas CSB: cámara de seguridad biológica. EPPs: elementos de protección personal

3.3.- CLASIFICACIÓN DE NIVELES DE BIOSEGURIDAD

3.3.1.-NIVEL DE BIOSEGURIDAD I

Es el nivel de seguridad requerido para trabajar con agentes biológicos del grupo de riesgo I, donde se emplean cepas no patógenas.



3.3.2.- NIVEL DE BIOSEGURIDAD II

Es el nivel obligado para trabajar con agentes del grupo de riesgo II. Personal especializado para el manejo de éstos microorganismos y corresponde a algunos laboratorios de microbiología clínica y de control de calidad sanitaria.

3.3.3.- NIVEL DE BIOSEGURIDAD III

Debe utilizarse cuando se manipulan agentes biológicos del grupo de riesgo III. El material biológico sólo puede ser procesado por personal calificado y en una zona con la infraestructura apropiada para el nivel de contención III, es decir: con aire acondicionado independiente, sin recirculación de aire, con gradiente de presión, cabinas de bioseguridad, entre otras características; correspondiendo a algunos laboratorios de microbiología clínica, de producción de biológicos y de control de calidad sanitaria

3.3.4.- NIVEL DE BIOSEGURIDAD IV

Nivel requerido cuando se procesa con certeza o se sospecha de un agente biológico de riesgo IV, especialmente patógeno infecto - contagioso, que produce alta mortalidad y para el que no existe tratamiento o es poco fiable. Este nivel también puede utilizarse para trabajar con animales de experimentación infectados por microorganismos del grupo de riesgo IV. ^{6, 10, 20}

3.4.-NORMAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO (baciloscopias) ^{7, 11}

Medidas generales

- ❖ El acceso al laboratorio está limitado a personal autorizado.



- ❖ El personal del laboratorio debe implicarse en el cumplimiento de las normas de seguridad.
- ❖ Las puertas de acceso al laboratorio y al área de Baciloscopía está debidamente marcada con la señalización internacional de riesgo biológico.
- ❖ Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente en cada cambio de turno.
- ❖ El laboratorio dispone de un sitio asignado exclusivamente para el lavado de manos.
- ❖ Todo el personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Para ello deben usarse guantes cuando se manipulen muestras que contengan posibles patógenos.
- ❖ Los guantes siempre serán desechados antes de salir del área de trabajo. Jamás se saldrá de la misma con los guantes puestos, ni se cogerá con ellos el teléfono, las órdenes de laboratorio, etc.
- ❖ Inmediatamente después de quitarse los guantes, se realizará un lavado de manos.
- ❖ Los guantes constituyen la medida de barrera más empleada para la protección de manos.
- ❖ Los barbijos sólo tiene utilidad para protección frente a polvo (partículas), aerosoles.
- ❖ Se usan gafas protectoras por el riesgo de salpicaduras o aerosoles.
- ❖ En la zona de trabajo no debe colocarse material de escritorio ni libros ya que el papel contaminado es de muy difícil la esterilización.¹¹



- ❖ Es necesario disponer de autoclave para autoclavar las muestra de esputo caso contrario espolvorear con cal viva.⁷

3.5.- BARRERAS DE PROTECCION SE DIVIDEN EN:

3.5.1.- Barreras físicas

3.5.2.- Barreras químicas

3.5.3.- Barreras Biológicas

3.5.1.- Barreras físicas.- Podemos mencionar a todo el equipamiento del laboratorio, cámaras de seguridad biológica, EPPs, Barbijos, Lentes, Guantes, Guardapolvos, Batas y Botas

3.5.3.- BARRERA BIOLÓGICA

3.5.3.1.- Inmunización activa:

- ❖ Vacunas e inmunización: La vacunación contra la hepatitis B, se realiza al personal del Hospital por cuanto la hepatitis B es una enfermedad transmitida por sangre, producida por un virus 100 veces más infectante que el virus HIV.

Cuando hay un accidente con riesgo biológico, se tiene en cuenta la importancia de la vacuna contra la Hepatitis B, debido a que frente a un accidente punzante con aguja contaminada con sangre infectada con HIV, la probabilidad de contagio es de alrededor del 0,4 %, mientras que si lo mismo ocurre con un elemento contaminado con virus de hepatitis B, es del 30 %.^{12,9}

El objetivo de estas vacunas es proteger a los trabajadores de salud, expuestos a factores de riesgo biológicos de adquirir infecciones por microorganismos susceptibles de ser



controlados mediante la aplicación de vacunas.¹² Las vacunas recomendadas para el personal de salud se presentan en la Tabla 2:

Tabla 2. PROTOCOLOS DE INMUNIZACIÓN RECOMENDADAS PARA PERSONAL DE SALUD

Biológico	Dosis	Vía	Esquema (en meses)
Hepatitis A	1 ml	Intramuscular	0, 6
Hepatitis B	1 ml	Intramuscular en deltoides	0, 1, 2, 12 0, 1, 6
Influenza	0,5 ml	Intramuscular	0, 12
(Triple Viral) Sarampión, Rubeola, Parotiditis	0,5 ml	Subcutáneo en brazo	Única No aplicar en embarazadas
Neumococo	0,5 ml	Subcutánea	Única
Tétanos Difteria (adultos)	1 ml	Intramuscular en deltoides	0, 1, 6 o 12 Refuerzo cada 10 años
Fiebre Amarilla	Dosis estándar	Subcutánea en brazo	Única. Áreas endémicas Refuerzo cada 10 años
Rabia	1 ml	Intramuscular (Células vera)	0, 7, 28 días. Refuerzo al año y luego cada tres años.

3.6.- PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE TUBERCULOSIS

En el marco de las políticas de salud y en respuesta a la situación epidemiológica del país, el Programa Nacional de Control de Tuberculosis (PNCT) en Bolivia, llega a constituirse en una prioridad nacional tanto por su magnitud como por su trascendencia, replanteando y



adecuando las normas técnicas nacionales, instrumentos de registro y estrategias. Inscribiéndose como un proyecto de extensión de coberturas en la captación de Sintomáticos Respiratorios (SR), detección de casos, fortalecimiento de las redes de salud y de los laboratorios. Como primer paso se realizará el examen bacilosκόpico directo de la muestra.

El examen microscópico directo o baciloscopia es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica en tuberculosis, tanto para el diagnóstico como para el control del tratamiento.

Los elementos que se requieren para efectuar la técnica son comunes, de bajo costo y habitualmente están disponibles aún en laboratorios de nivel básico.

El uso de la baciloscopia en el diagnóstico de tuberculosis pulmonar permite identificar con una sensibilidad del 90 % y una especificidad del 98 % a los enfermos bacilíferos ya que expectoran una cantidad suficientemente grande de bacilos.¹³ (se considera que una caverna de 1 cm² tiene una población bacilar de 108). Para identificar al bacilo de Koch se utiliza la: **técnica de Zihel-Neelsen**, donde con un frótis seco y fijado se recorren los siguientes pasos: (representados en la tabla 3)

Tabla N°3 PASOS DE LA TINCIÓN ZIHEL-NEELSEN

Coloración	Fucsina + calor (calor hasta emisión de vapor; no ebullición)	5'
Decoloración	Alcohol-Acido	3 a 5'
Col. de contraste	Azul de metileno	1'



Si bien la baciloscopía es la más utilizada para diagnóstico de tuberculosis en casos extra pulmonares, como tuberculosis renal y otras donde el diagnóstico debe detectar al bacilo de Koch en diferentes fluidos orgánicos, siendo que la baciloscopía tiene una baja sensibilidad ya que el bacilo se encuentra en menor concentración en estos casos se recomienda hacer cultivo, también se han desarrollado diferentes técnicas, incluidas las técnicas moleculares que coadyuven a identificar en un tiempo breve al bacilo de Koch entre ellas las nombraremos las más utilizadas.

3.7.-CULTIVO DE LAS MICOBACTERIAS

Que permite reconocer la especie y obtener el antibiograma, pero se necesitan de 3 a 4 semanas para la identificación bacteriana. Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar o cultivar la muestra serán enviadas con el formulario N°4 (**anexo**) tras su adecuada digestión y descontaminación, si fueran necesarias antes de sembrar en medios de cultivo adecuados por las siguientes razones:

Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, al punto que pueden detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por ml de muestra clínica digerida y concentrada.

El aislamiento en cultivo puro es necesario para poder identificar la especie de las cepas aisladas.

Si la baciloscopía es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente.

Digestión y descontaminación de muestras. Es un paso previo al cultivo del que dependen en gran medida los resultados de éste.



La mayor parte de las muestras clínicas contienen gran cantidad de microorganismos de la flora comensal que crecen con mayor rapidez que *M. tuberculosis*, que tiene un tiempo de generación de 18-24 h. Es necesario eliminar de la muestra estos microorganismos contaminantes que impedirían el desarrollo de las micobacterias.

También es importante conseguir la licuefacción de los restos orgánicos (tejidos, moco, suero y otros materiales proteináceos) que rodean a los microorganismos, para que los agentes descontaminantes puedan destruir las bacterias no deseadas. Así, sobrevivirán las micobacterias y podrán tener acceso a los nutrientes del medio. Las micobacterias son más resistentes a los ácidos y bases fuertes que otros microorganismos, lo que permite utilizar con éxito estas técnicas de digestión-descontaminación. Pero si éstas no se utilizan adecuadamente pueden afectar también la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra y dar lugar a falsos cultivos negativos (por exceso de descontaminación) o a un número elevado de contaminaciones (por defecto de descontaminación).

3.7.1.- MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Disponemos de diferentes tipos de medios adecuados para el aislamiento de micobacterias a partir de muestras clínicas.

Los más utilizados son los que tienen como base el huevo (Löwenstein-Jensen, Colestos, etc.) Y los semisintéticos con agar (7H10 y 7H11 de Middlebrook).

Algunas micobacterias, o muchas de ellas relacionadas con el HIV, tales como *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. genavense* *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, exigen suplementar los medios de cultivo con factores de crecimiento especiales (hemina, sangre, micobactina o citrato amónico férrico, etc.).



La incubación de los medios sembrados en una atmósfera enriquecida con un 5 - 10% de CO₂ favorece el crecimiento de *M. tuberculosis*. Cualquiera que sea el medio de cultivo utilizado, el tiempo transcurrido entre la recepción de la muestra y la emisión del resultado suele ser de 3 a 6 semanas.

El número de colonias obtenidas por cultivo se debe cuantificar de alguna manera en el momento de emitir el informe al clínico.

3.7.2.- NUEVOS MÉTODOS DE CULTIVO⁴⁰⁻⁴²⁻⁴⁴. La búsqueda de técnicas más rápidas y sensibles de cultivo ha permitido introducir en los laboratorios clínicos:

Los métodos radiométricos (sistema BACTEC®);

Medios de cultivo bifásicos (MB-Septi- Check®),

Técnicas adecuadas para aislar micobacterias de la sangre (hemocultivo).¹³

3.7.2.1.- MÉTODOS RADIOMÉTRICOS

(Sistema BACTEC®) 40,44. Detectan automáticamente el crecimiento micobacteriano midiendo la cantidad de ¹⁴CO₂ producido por la metabolización de sustratos (ácidos grasos) marcados con ¹⁴C. Se utilizan viales que contienen 4 ml de medio 7H12 de Middlebrook que admiten inóculos de hasta 0,4 ml.

En relación a los sistemas tradicionales de cultivo el sistema BACTEC® tiene las siguientes ventajas:

Ahorro de tiempo (15-20 días) en la detección del crecimiento.

Mayor sensibilidad, tanto para el aislamiento de *M. tuberculosis* como de otras micobacterias.



Posibilidad de identificar *M. tuberculosis* en 4-5 días y de realizar antibiogramas a los fármacos de primera elección (incluyendo la Pirazinamida) en tiempos medios de 3-6 días, en lugar de los 21-42 días que exigen los métodos convencionales.

El principal inconveniente del sistema BACTEC® reside en tener que trabajar con 14C, lo que requiere disponer de los permisos necesarios para la manipulación y almacenamiento de este compuesto.

Para laboratorios de nivel II y III el sistema BACTEC® es recomendada, sin duda, el avance diagnóstico más contrastado y útil en mico bacteriología clínica.

Para tratar de eliminar el uso de 14C se trabaja actualmente con técnicas que permiten detectar el crecimiento mico bacteriano mediante fluorimetría. Los medios que se están probando llevan incorporado un compuesto de rutenio que emite fluorescencia detectable a medida que disminuye la tensión parcial de O₂ del medio como consecuencia del metabolismo microbiano. Esta medición del crecimiento por fluorimetría sustituirá en un próximo futuro a los métodos radiométricos.¹³

3.7.3.- LAS PRUEBAS RÁPIDAS Y DIRECTAS

Que detectan ácidos nucleicos resultan atractivas para el diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis. Se han utilizado sondas de ácidos nucleicos para la identificación de mico bacterias en cultivo, pero carecen de sensibilidad cuando se utilizan en la detección directa en muestras biológicas.

3.7.3.1.- SONDAS GENÉTICAS^{40, 50,51}. Una sonda es un reactivo biológico constituido por un fragmento de ADN que posee una secuencia de bases complementaria a la del



genoma de un microorganismo. Las sondas están marcadas con diversos indicadores fáciles de detectar: isótopos radiactivos (sondas calientes) o sustratos cromógenos (sondas frías).

Cuando se libera el ácido nucleico de un microorganismo y después se desnaturaliza el ADN liberado (se separan las dos hebras que forman la molécula de ADN por procedimientos físicos $[-Ta\ 90\ a\ 140\ ^\circ C-]$), la sonda es capaz de fijarse (hibridarse) con su fragmento homólogo, si existe. La hibridación de la sonda a su fragmento homólogo se detecta fácilmente gracias al marcador que se ha incorporado.

Actualmente se dispone de sondas frías (Gen-Probe®, Syngene®) para identificación de: *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. gordonae*.

No existen sondas comercializadas para el resto de especies de micobacterias.

Entre las principales ventajas de las sondas genéticas hay que destacar la sencillez de su manipulación, que permite su adaptación a cualquier laboratorio. El principal inconveniente es su coste. Es una tecnología muy utilizada en la actualidad en laboratorios de nivel II.

Estudios de sensibilidad in vitro 40. Los estudios de sensibilidad in vitro de *M. tuberculosis* pueden realizarse directamente a partir de la muestra recibida en el laboratorio para el diagnóstico de la tuberculosis, cuando en ella se observan abundantes bacilos en el examen microscópico (Método directo) o a partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (método indirecto).

Los métodos estandarizados para el estudio de sensibilidad in vitro de *M. tuberculosis* son: el de las proporciones y diluciones múltiples de Canetti, el de la concentración absoluta de Meissner y el del nivel de resistencias de Mitchison; todos ellos en medio de Löwenstein-



Jensen. Los Center for Diseases Control de Atlanta (EE.UU.) recomiendan el método de las proporciones, pero en medio semi sintético 7H10 de Middlebrook.

Actualmente pueden realizarse estudios de sensibilidad por técnica radiométrica (BACTEC®) utilizando una variante simplificada y adaptada del método de las proporciones de Canetti.

El laboratorio debe informar al clínico acerca de la cuantía del crecimiento que se ha producido en los medios con fármacos antituberculosos en comparación con los medios sin fármaco. En un antibiograma realizado adecuadamente, el control tendrá colonias contables, y el recuento de colonias en el medio con fármaco y en el control permitirá calcular la proporción de bacilos resistentes en la población total y expresada como porcentaje. En general, cuando el 1% o más de la población bacilar se hacen resistentes a la concentración crítica de un fármaco, entonces el agente no es, o pronto no será, útil para continuar el tratamiento porque la población resistente será predominante en poco tiempo.

El tiempo de lectura de un antibiograma en medio de Löwenstein-Jensen es de 4-5 semanas, en medios semisintéticos (7H10 o 7H11 de Middlebrook) de 2-4 semanas y en el BACTEC® de 5-8 días.¹⁴

3.7.4.- LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) es una técnica de la biología molecular que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN o RNA que puede ser detectada tras electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La técnica puede realizarse en tan solo 24 a 48 horas.

*PCR*58-60. Desde su introducción en 1985, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite sintetizar por vía enzimática millones de copias de un fragmento específico de



ADN, se vislumbró como una técnica que podía revolucionar por su rapidez y sensibilidad el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

La extraordinaria sensibilidad de esta técnica es a la vez su principal atractivo e inconveniente ya que la contaminación de la muestra con una sola copia de la secuencia a amplificar es suficiente para dar lugar a un falso positivo. Por otro lado, la presencia de inhibidores enzimáticos en determinadas muestras clínicas, así como su laboriosidad y costes en espacio y equipos, ha impedido durante algunos años, a pesar de los excelentes resultados obtenidos en estudios de investigación preliminares, su introducción en la práctica clínica para el diagnóstico de la tuberculosis.

Ha sido necesario que las grandes compañías multinacionales del mundo de los reactivos de laboratorio introdujeran en el mercado equipos más o menos sofisticados y reactivos de gran calidad que simplifican, facilitan o automatizan las reacciones de amplificación, para que esta tecnología pueda ser aplicada con las debidas garantías en el diagnóstico de la tuberculosis.

El sistema Amplicor TB® (Roche Diagnostic Systems) se ha introducido recientemente en el mercado y ya está preparado para su presentación en su versión totalmente automatizada (Cobas Amplicor®). En este sistema se amplifica por PCR un fragmento del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S, posteriormente se hibrida el producto amplificado a una sonda marcada enzimáticamente y la detección del producto amplificado se realiza mediante una reacción colorimétrica. Evaluada en dos estudios recientes en su versión no automatizada, esta prueba ha resultado tener una sensibilidad del 66-82 % y especificidades del 99-100 % en muestras respiratorias. Los valores predictivos positivos y negativos



oscilan entre 91-100 % y 97-98 %, respectivamente. En estudios preliminares de evaluación en muestras clínicas diferentes a las respiratorias, el sistema Amplicor TB® tiene una eficacia mucho menor. Los inhibidores de la ADN polimerasa presentes en algunas muestras clínicas pueden ser causa de falsos negativos.

Dentro de lo que se han dado en llamar técnicas de amplificación de segunda generación, el sistema Gen-ProbeAmplified MTD® (Gen-Probe, Inc., USA), diseñado inicialmente también para trabajar con muestras respiratorias, se ha adaptado recientemente para ser utilizado en líquidos estériles, aspirados gástricos, orinas, sangre y otras muestras clínicas. De los sistemas actualmente comercializados, es el que ha sido más evaluado y del que se dispone de mayor experiencia clínica. En el sistema Gen-ProbeAmplified MTD® se amplifica ARNr 23S mediante la síntesis de cADN y ARN, utilizando una mezcla enzimática compuesta principalmente por transcriptasa inversa y ARN polimerasa. La utilización de una diana de amplificación particularmente abundante como es el rARN aumenta el rendimiento del proceso de amplificación de los ácidos nucleicos y los hace resistentes a la amplificación de errores de transcripción que pueden tener lugar en Diagnóstico de la tuberculosis los primeros ciclos de amplificación. La utilización de ARN, mucho más lábil que el ADN, y un único tubo de reacción para cada muestra durante todo el proceso, previene el riesgo de contaminación por amplicones. Este proceso de amplificación isotérmico y autocatalítico permite amplificaciones del orden de millones de veces en una incubación de 2h a 42 °C. La detección de las secuencias diana en los amplicones tiene lugar mediante una sonda específica de ADN marcada con éster de acridina quimioluminiscente. Un proceso químico selectivo, Prueba de Protección de la



Hibridación (HPA), permite distinguir las sondas hibridadas sin utilizar complejos métodos físicos de separación. El resultado final es una prueba de sensibilidad superior al cultivo y exquisita especificidad, que no requiere instalaciones o instrumentación sofisticada y que puede llevarse a cabo en la rutina de la mayoría de laboratorios clínicos, permitiendo la realización de 50 muestras clínicas en menos de 5 horas. Debido a que la presencia de rARN en las células se cuenta por miles de copias, la probabilidad de iniciar una amplificación correcta es mucho más elevada que en aquellas pruebas en las que se utiliza como diana una o escasas copias de ADN. En la práctica, los principales inconvenientes de esta técnica son la posibilidad real de contaminación por amplicones por defectos de manipulación y que aún no disponemos de ellas en su versión completamente automatizada.

Los progresos en este campo han sido espectaculares en los últimos años y están a punto de introducirse en el mercado nuevos sistemas de amplificación de segunda generación:

Qbreplicasa (Galileo-Probe Amplification®, Gene-Trak), Nasba® Amplification System (OrganonTecnika N.Y.), Strand Displacement Amplification® (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems), etc. Todos estos nuevos sistemas, y otros que seguramente se irán introduciendo en los próximos años, pueden incluso superar la eficacia diagnóstica de los sistemas actualmente comercializados.¹⁵



4.- MARCO REFERENCIAL

Con el propósito de llevar a cabo este trabajo, se tomó como centro de referencia al Hospital Juan XXIII, ya que este se constituye en un importante nosocomio.

El Hospital JUAN XXIII es un Hospital de segundo nivel que cuenta con un personal capacitado, como ser Médicos, Bioquímicos, Licenciadas en Enfermería, técnicos, auxiliares en enfermería y personal de apoyo.

El Hospital Juan XXIII de la Ciudad de La Paz, dependiente del Arzobispado, se halla ubicado en zona de Munaypata Av. Naciones Unidas. Donde la Directora es Lic. Pilar Cabero. Este nosocomio se fundó el 3 de junio de 1976. El Hospital cuenta con los servicios de Emergencias, Medicina general, Ginecología, Dermatología, Oftalmología, Traumatología, Cirugía general, Neurología, Pediatría, Gastroenterología, Urología, Otorrinolaringología, Unidad de Terapia Intensiva, Terapia Neonatal o Neonatología, Dental. Servicio complementarios de Laboratorio clínico, Anatomía Patología, Ecografía, Rayos X, Tomografía.

El Laboratorio del Hospital es un laboratorio de segundo nivel cuenta con áreas de Toma de Muestra, Hematología, Química sanguínea, Serología, Bacteriología, Orinas, Coproparasitología.

El Laboratorio del Hospital en franco proceso de transformación y equipamiento, cuenta con un personal capacitado que atiende pacientes del SUMI, SSPAM, y pacientes en general. El personal está capacitado para dar un servicio de calidad y eficiente.



5.- JUSTIFICACIÓN

Elaborar un manual para el examen de baciloscopia en el Hospital Juan XXIII debido a que la unidad de Laboratorio carece de un manual específico para el diagnóstico del *M. tuberculosis*. Y el mismo constituye un instrumento necesario, donde encontraremos detalladamente los pasos a seguir desde la toma de muestra, procedimiento y emisión de informe final.

El trabajo se realizara en base a la investigación y recolección documental de diferentes libros, manuales, revistas e información en internet. Que existen en el medio e internacional todo esto se utilizara para su compilación.

La finalidad de este trabajo dirigido es contribuir con este manual, para el área Bacteriología (Baciloscopia) del laboratorio del Hospital Juan XXIII, tomando en cuenta la preparación del paciente, recolección de las muestras y procesamiento de las mismas en forma adecuada. El personal podrá contar con un manual para trabajar, todo ello aplicando procedimientos establecidos que contemplen además normas de Bioseguridad y de calidad del trabajo para emisión de resultados confiables, reproducibles y oportunos.



6.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Elaborar un manual de procedimientos técnicos para realizar el examen de baciloscopia donde se incluyan normas generales de bioseguridad para la aplicación en el laboratorio clínico del Hospital Juan XXIII.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Elaborar los procedimientos y técnicas para recolección y manejo de la muestra, conservación y transporte , procedimiento de recepción y registro de la muestra, preparación del extendido, tinción ,examen microscópico directo de la baciloscopia, e informe final de los resultados.
- ❖ Implementar las normas de bioseguridad que prevengan y minimicen los factores de riesgo y mejorando las condiciones del trabajador en salud, protegiéndolos de los potenciales efectos sobre la salud causados por la exposición accidental a los microorganismos.
- ❖ Implementar el uso de este manual, con el fin de dar mayor calidad al diagnóstico de la tuberculosis, facilitando el trabajo del análisis en el laboratorio.

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

Material de escritorio para la redacción

Libros, Revistas de consulta

8.- RESULTADOS:

Los resultado de esta recopilación de información de hallan descritos directamente en el manual que a continuación se presenta.

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA BIOQUÍMICA**

**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS PARA
REALIZAR EL EXÁMEN DE BACILOSCOPIA DONDE SE
INCLUYAN NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD,
PARA LA APLICACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO
DEL HOSPITAL JUAN XXIII.**

**LAPAZ – BOLIVIA
2012**

TABLA DE CONTENIDO MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

I.- BIOSEGURIDAD.....	1
a) Guardapolvo.....	1
b) Batas.....	1
c) Gafas de seguridad.....	2
d) Barbijos.....	2
e) Guantes.....	2
f) Recipientes para muestras.....	3
g) Transporte de muestras.....	3
h) Recepción de las muestras.....	3
i) Apertura de los envases.....	3
j) Desinfectantes.....	4
II MANEJO DE DESECHOS EN EL LABORATORIO.....	5
a) Generalidades.....	5
b) Transporte de los desechos de residuos infecciosos.....	5
c) Eliminación de residuos.....	5
III.- EXÁMEN BACILOSCÓPICO.....	7
ALGORITMO PARA EL EXAMEN BACILOSCOPICO.....	8
IV.- RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA.....	9
V.- CARACTERÍSTICA DE LA MUESTRA.....	9
a) Expectoración natural.....	9
b) Expectoración inducida.....	9
VI.- CARACTERÍSTICAS DEL ENVASE.....	10
VII.- CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA.....	11
VIII.- PROCEDIMIENTO DE RECEPCIÓN.....	12
IX.- PROCEDIMIENTO DE REGISTRO.....	12
X.- PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO.....	13
a) Área de trabajo.....	13
b) Equipo y material.....	14
c) Procedimientos específicos para realizar el frótis.....	14

XI.- TINCION: TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN	18
a) <i>Colorante fucsina.....</i>	<i>18</i>
b) <i>Decoloración</i>	<i>19</i>
c) <i>Coloración de fondo.....</i>	<i>19</i>
XII.- LECTURA DE EXTENDIDOS COLOREADOS POR ZIEHL NEELSEN.....	21
XIII.- INTERPRETACIÓN E INFORME DE RESULTADOS	24
a) <i>Registro de resultados</i>	<i>25</i>
b) <i>Limpieza del microscopio.....</i>	<i>26</i>
XIV.- CONSERVACIÓN DE BACILOSCOPIAS PARA SUPERVISIÓN	26
XV.- CAUSAS DE ERROR EN LA BACILOSCOPIA.....	27
a) <i>Relacionadas con la muestra.....</i>	<i>27</i>
b) <i>Relacionadas con la preparación del frótit.....</i>	<i>27</i>
c) <i>Relacionadas con la tinción.....</i>	<i>28</i>
d) <i>Relacionados con la lectura.....</i>	<i>28</i>
e) <i>Mantenimiento del Microscopio</i>	<i>29</i>
f) <i>Cuidados Básicos.....</i>	<i>29</i>
XVI.- CONTROL DE CALIDAD	31
a) <i>Control de calidad interno</i>	<i>31</i>
<i>Control de calidad del microscopio.....</i>	<i>31</i>
<i>Control de calidad de colorantes.....</i>	<i>32</i>
<i>Control de calidad de la solicitud.....</i>	<i>32</i>
<i>Control de calidad del cuaderno de registro.....</i>	<i>32</i>
<i>Control de calidad de recepción.....</i>	<i>32</i>
<i>Control de calidad de la técnica.....</i>	<i>33</i>
<i>Control de calidad del reporte.....</i>	<i>33</i>
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34



I BIOSEGURIDAD

Las normas de seguridad biológica (bioseguridad) son herramientas probadamente eficaces para evitar la contaminación accidental con microorganismos patógenos contenidos en las muestras. A los que está expuesto el personal en los laboratorios para ello sea recomendado el uso de: **DE LOS ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL**. Los elementos de protección personal son un complemento indispensable de los métodos de control de riesgos para proteger al trabajador.

LOS PRINCIPALES ELEMENTOS DE PROTECCIÓN PERSONAL (EPPs) SON:

a) Guardapolvo

b) Batas

- ❖ La bata es de otro color, (Celeste o verde) para diferenciarlas de los que se usan en áreas contaminadas. Las batas o delantales de laboratorio son de manga larga, utilizados en el laboratorio de baciloscopia para mayor protección. En áreas limpias y de libre circulación debe usarse guardapolvo.
- ❖ Antes de abandonar el laboratorio, tendrán que quitarse las prendas protectoras y lavarse las manos.



Vestimenta para realizar baciloscopia
Figura 1



c) Gafas de seguridad

Para proteger los ojos y el rostro de las salpicaduras es importante el uso de gafas en el área contaminada. Fuera de ellos no se los puede usar.

d) Barbijos

Es indispensable el uso del barbijo para no inspirar los aerosoles que emiten al abrir el frasco de la muestra. Para que la protección sea máxima, los barbijos deben ajustarse al rostro de cada trabajador. La más recomendada es; NIOSH 95 diseñadas para proteger de las exposiciones a agentes biológicos. Los barbijos no deben usarse fuera del laboratorio.



Barbijos NIOSH 95, recomendado para trabajar con *M. tuberculosis*. Debe tener inscrita la denominación NIOSH 95 o N 95.

Figura: 2

e) Guantes

Para evitar un contacto directo con la muestra es imprescindible el uso de los guantes. Después de manipular material infeccioso es preciso retirar los guantes y lavarse las manos concienzudamente.

Los guantes desechables usados deben eliminarse junto con los residuos de laboratorio infectados. Los guantes no deben usarse fuera del laboratorio.



f) Recipientes para muestras

Los recipientes para muestras son de plástico y duras para no permitir fugas, la tapa debe estar correctamente colocada. En el exterior del recipiente no debe quedar ningún material.

Los recipientes han de estar correctamente rotulados para facilitar su identificación.

g) Transporte de muestras

Para evitar fugas o derrames accidentales, deben utilizarse embalajes secundarios (Por ejemplo, bolsa de plástico cajas etc.) las muestras deben mantenerse en posición vertical.



Embalajes secundarios
Figura: 3

h) Recepción de las muestras

El Laboratorio recibe muestras para baciloscopías y tiene un área designado para la recepción de muestras.

i) Apertura de los envases

El personal que recibe y desempaqueta las muestras debe conocer los riesgos para la salud (al inhalar las gotitas fluger puede contagiarse y contaminar el laboratorio) que entraña su actividad y debe estar capacitado en el área de baciloscopia para adoptar precauciones normalizadas particularmente cuando manipule recipientes rotos o con fugas.¹⁷ En estos casos los recipientes primarios de las muestras deben abrirse en la cámara antes de procesar la baciloscopia.

Cámaras cerradas con una abertura al frente para permitir el acceso de los brazos del operador. El aire ingresa por la abertura frontal, atraviesa la zona de trabajo y sale al exterior a través de un filtro HEPA.

La velocidad de flujo de aire es de unos 0,40m/s.

A = Abertura frontal

B = Ventana

C = Escape con filtro HEPA

D = Extractor de aire

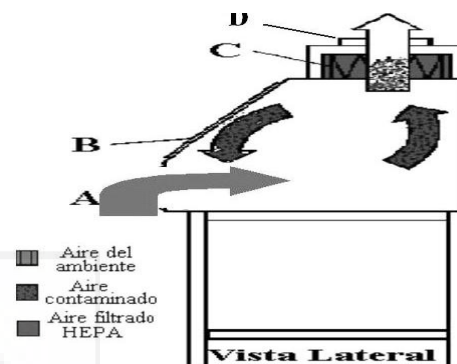


Figura 4

j) Desinfectantes.

Para descontaminar el área de trabajo y el material usado se utiliza hipoclorito al 1%. Y

En la elección del desinfectante adecuado se debe considerar:

- ❖ El microorganismo al que va dirigido.
- ❖ La concentración utilizada.
- ❖ El tiempo de contacto.
- ❖ Recomendados para el laboratorio de tuberculosis (hipoclorito de sodio al 1%)

Los más apropiados para el uso en el laboratorio de tuberculosis son aquellos que contienen fenoles, hipocloritos o alcoholes. Esta solución de trabajo debe ser de preparación reciente.

Su almacenamiento prolongado disminuye su actividad desinfectante.¹⁶

Especificaciones de uso:

Hipoclorito se utiliza a una concentración del 1%. El tiempo de contacto es de 15 a 30 minutos.⁷

- ❖ Cuando se contaminan las manos es útil enjuagarse con alcohol al 70% y después lavarse con agua y jabón abundantes.



II MANEJO DE DESECHOS EN EL LABORATORIO

a) Generalidades

El manejo y tratamiento de los desechos infecciosos debe considerarse antes, durante y después de realizadas las actividades de laboratorio. Debe ser considerada como una parte importante de la bioseguridad en el laboratorio. Los desechos que se generan pueden estar contaminados por microorganismos o contener sustancias químicas tóxicas y peligrosas.

b) Transporte de los desechos de residuos infecciosos

Los recipientes para desechar los residuos de riesgo deben ser rígidos, impermeables, resistentes a ácidos, álcalis y de cierre hermético.

El tiempo de almacenamiento en el laboratorio (almacenamiento intermedio) no debe superar las 24 horas, el cual se cuenta una vez que el recipiente ha sido llenado hasta 3/4 partes y cerrado.

Deberá evitarse originar aerosoles durante el transporte de los residuos biológicos, en especial aquellos que contengan patógenos cuya vía de transmisión sea la aérea. Los recipientes que los contengan se manipularán sin hacer movimientos bruscos.¹⁶

c) Eliminación de residuos

La eliminación de los residuos generados en establecimientos de salud debe ajustarse a lo estipulado en las normas bolivianas NB 69001 a la NB 69007 y su reglamento. Que clasifica los residuos de la siguiente manera:⁷



TABLA N° 1

Clase	Sub. Clase	Tipo de Residuo
Clase A Residuos Infecciosos	A-1	Biológico
	A-2	Sangre hemoderivados, fluidos corporales
	A-3	Quirúrgicos, anatómicos, patológicos
	A-4	Corto punzantes
	A-5	Cadáveres o parte de animales contaminados
	A-6	Asistencia a pacientes con aislamiento
Clase B Residuos especiales	B-1	Residuos radioactivos
	B-2	Residuos farmacéuticos
	B-3	Residuos químicos peligrosos
Clase C Residuos Comunes		Asimilables a los generados en el domicilio

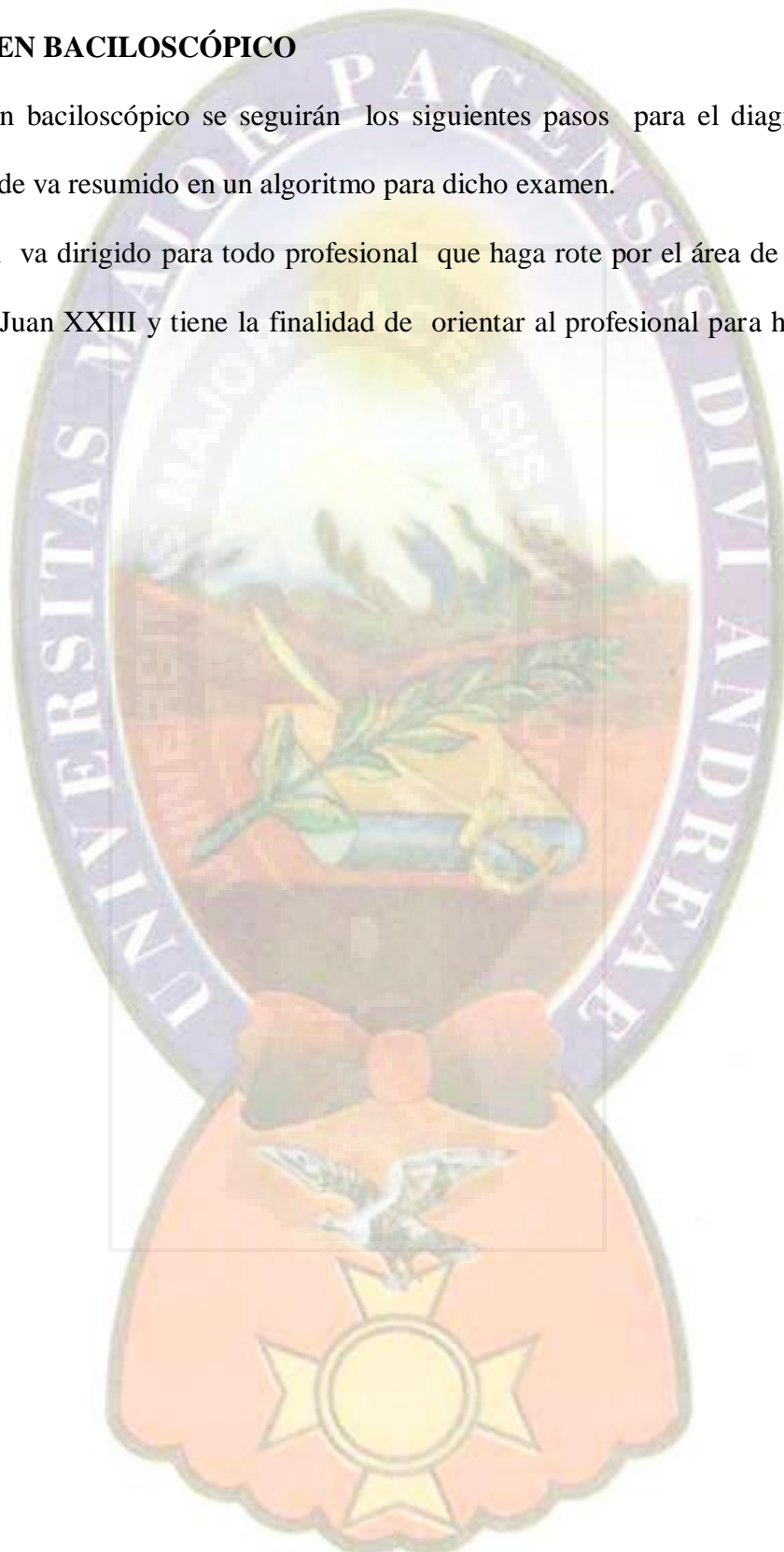
La muestra de esputo ya trabajada si no se autoclava se debe espolvorear con cal viva antes de desechar.



III.- EXÁMEN BACILOSCÓPICO

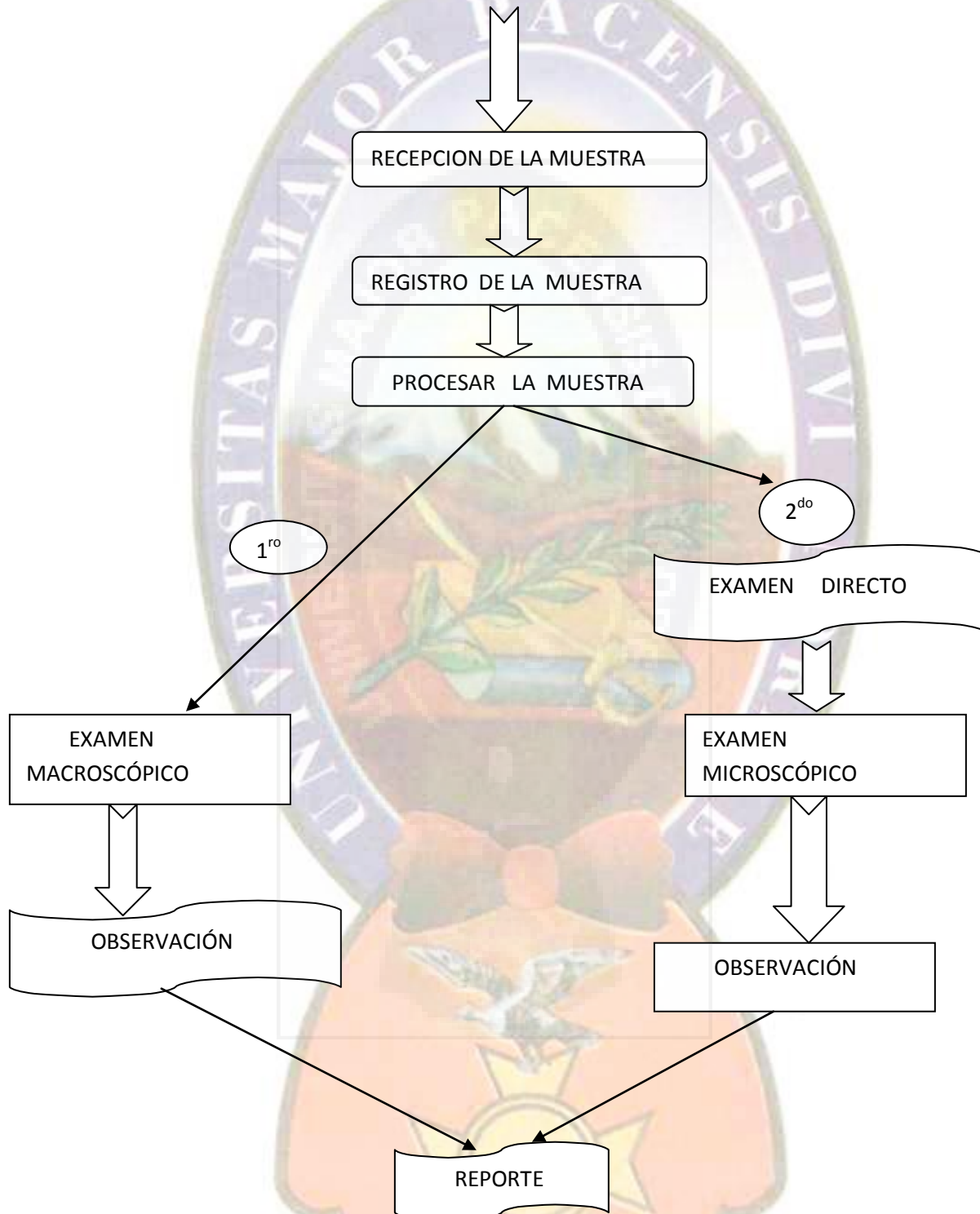
En el examen bacilosκόpico se seguirán los siguientes pasos para el diagnóstico de la muestra, donde va resumido en un algoritmo para dicho examen.

Este manual va dirigido para todo profesional que haga rote por el área de Baciloscopia del Hospital Juan XXIII y tiene la finalidad de orientar al profesional para hacer un buen diagnóstico.





ALGORITMO PARA EL EXAMEN BACILOSCOPICO





IV.- RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Para que el laboratorio pueda obtener un resultado confiable y útil, es preciso ejecutar las técnicas en forma correcta y contar con una muestra biológica adecuada cuyas características son:

- ❖ Provenir del sitio de la lesión a investigar.
- ❖ Ser en cantidad suficiente (3-5 ml).
- ❖ Estar colocada en envase adecuado y limpio.
- ❖ Haber sido conservada y transportada correctamente.

V.- CARACTERÍSTICA DE LA MUESTRA

a) **Expectoración natural.** La muestra más adecuada para la baciloscopia es el esputo obtenido por expectoración natural. Una buena muestra de esputo es la que proviene del árbol bronquial, obtenida después de un esfuerzo de tos y no la que se obtiene de faringe o por aspiración de secreciones nasales o saliva.



Figura 5a. Respiración profunda, al toser el paciente proporciona la muestra

Figura 5b. Recolección de esputo bronquial de las profundidades del árbol respiratorio que deposita en el frasco.

b) **Expectoración inducida.** Cuando el paciente no logra expectorar y es necesario un examen de esputo, se puede recurrir a la expectoración inducida.

c) Número de muestras.

Debido a que la eliminación de bacilos no es continua, es imprescindible analizar tres muestras de cada tosedor, obtenidas de acuerdo a las siguientes indicaciones.

d) Para el diagnóstico se requieren tres muestras.

- ❖ La primera cuando se identifique al tosedor.
- ❖ La segunda al despertar a la mañana siguiente a la toma de la primera muestra.
(Al despertar después de un esfuerzo se recolecta la muestra)
- ❖ La tercera al entregar la segunda en la unidad de salud.¹⁷

VI.- CARACTERISTICAS DEL ENVASE

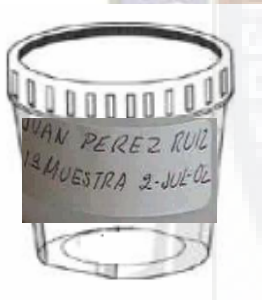


Figura6

Envase recomendado para la recolección de esputo

El envase para la muestra debe reunir las siguientes características

- ❖ Boca ancha de aproximadamente 6 cm de diámetro, que facilite la recolección y permita al laboratorista elegir la porción mucopurulenta de la muestra.
- ❖ Tapa a rosca, para disminuir el riesgo de derramar la muestra durante el transporte y de producir aerosoles al abrirla en el laboratorio.
- ❖ Etiquetado correctamente para que permita la identificación del envase.



- ❖ Capacidad de 50 a 60 ml aproximadamente, para recolectar un volumen suficiente de muestra.
- ❖ De pared lisa y semitransparente, para poder juzgar la calidad de la muestra sin abrir el envase.
- ❖ Desechable, para facilitar su eliminación.

VII.- CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA

El tiempo de entrega debe ser lo más antes posible para que llegue la muestra al laboratorio.

La muestra debe procesarse en el mismo día de la recolección. Si esto no es posible conservarla en refrigeración. La exposición de la muestra a la temperatura ambiente favorece la multiplicación de otros gérmenes habituales de la boca que degradan mucopolisacáridos y proteínas, que licuan la muestra y favorecen la muerte y degradación del bacilo. Estos eventos reducen la probabilidad de contar con una porción útil de muestra que permita la identificación del bacilo.

Transporte es conveniente llevarlas en cajas con divisiones interiores para el envío de las muestras. Además, asegurar la tapa de cada frasco, colocarlo dentro de una bolsa de plástico.



Figura7

Trasporte de muestras

a) Durante el transporte es indispensable evitar:

- ❖ La exposición al calor excesivo.
- ❖ La exposición a la luz solar directa.



- ❖ El derrame del contenido del envase.

Cada muestra debe ir acompañada de un formulario correspondiente: “Formato para el envío de muestras” debidamente llenados. Dichos formatos y las instrucciones de llenado correspondientes se incluyen en formulario N°2 (anexos) de este manual. Durante el transporte, estos documentos deben ir separados de los envases que contienen las muestras.

VIII.- PROCEDIMIENTO DE RECEPCIÓN.

El personal del laboratorio al recepcionar la muestra, debe valorarlas y proceder de acuerdo a lo siguiente:



Figura 8

- ❖ Comprobar que las muestras estén bien rotuladas (la etiqueta con los datos del paciente deberá estar colocada en el cuerpo del envase; nombre completo, fecha, número de la muestra) y que corresponda su documentación.
- ❖ Si existe un pequeño derrame del contenido se debe desinfectar con hipoclorito de sodio al 1%.¹⁷
- ❖ Evaluar la calidad y cantidad de la muestra, anotar dicha información en el registro N°5 (anexos) de este manual.

IX.- PROCEDIMIENTO DE REGISTRO. Registrar en el libro de actas general del laboratorio que tiene por objeto dejar la constancia de la recepción de la muestra. Y para la baciloscopia se tiene otro registro interno del laboratorio donde se registran datos importantes del paciente (nombre, edad, fecha, dirección, calidad de la muestra, número de muestra, control mes de tratamiento, y observaciones)



Y los resultados obtenidos. Ver en este manual
Formulario N° 5 (Anexos).



Figura 9

X.- PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO

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

a) Área de trabajo.

El área de trabajo para baciloscopías se tiene un mesón de azulejos, pero se recomienda que sea recubierta de material (de preferencia acero inoxidable) para que pueda desinfectarse fácilmente con soluciones como el hipoclorito 1 %. Otra mesa de para realizar la observación microscópica y el registro de resultados.



Figura 10

b) Equipo y material

- ❖ Microscopio binocular con oculares 10x, 40x y lente objetivo de inmersión 100x en excelentes condiciones de funcionamiento.¹⁷
- ❖ Tarja para tinciones, mechero bunsen.
- ❖ Material de vidrio para la preparar: soluciones, colorantes etc.
- ❖ Pizeta, embudos, lápiz de punta de diamante.
- ❖ Frascos para soluciones colorantes y reactivos preparados.
- ❖ Envases para muestras, aplicadores de madera.
- ❖ Portaobjetos nuevos.
- ❖ Frasco con hipoclorito al 1% para desechar los aplicadores usados.
- ❖ Gradillas para láminas.
- ❖ Aceite de inmersión.

c) Procedimientos específicos para realizar el frótis



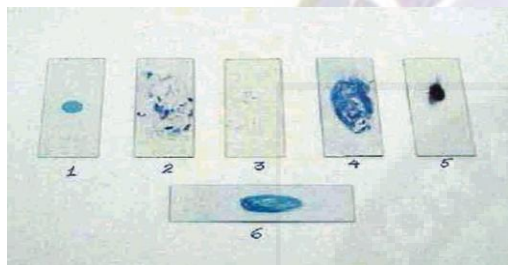
Figura 11

- ❖ Ubicar en la mesa de superficie lisa, bandeja o papel embebido en hipoclorito de sodio al 1%
- ❖ No más de 12 envases con las muestras.
- ❖ Ubicar al lado de la mesa el recipiente para descartar el material con tapa
- ❖ Ordenar las muestras según su número.



- ❖ Para cada muestra, enumerar una lámina portaobjetos, siempre en el mismo borde. debe ser el mismo número asignado en el Registro del laboratorio, y en la orden de para el examen.
- ❖ Si las muestras estuvieron en movimiento, dejar reposar los envases durante 20 minutos antes de comenzar a abrirlos. (Para evitar a que se derramen)
- ❖ Destapar con cuidado el envase.
- ❖ Partir un aplicador en dos, tratando de que las puntas queden ásperas.
- ❖ Tomar una parte del aplicador con la mano izquierda y la otra con la derecha, entre el pulgar y el índice, y con los extremos irregulares seleccionar la partícula más densa o purulenta de la muestra de esputo enrollarla en una de los dos partes del aplicador con la ayuda de la otra. Si la muestra contiene varias porciones mucopurulento, tratar de mezclarlas con movimientos muy suaves del aplicador y luego tomar una porción de la mezcla. Si sólo hay pequeñas partículas purulentas, escoger tres o más y mezclarlas en el mismo portaobjetos para homogeneizarlas colocar la(s) partícula(s) seleccionada(s) sobre el portaobjetos y extenderlas (s) con el aplicador con movimientos suaves, circulares, tratando de dispersarla en forma homogénea en el centro de la lámina, dibujando un círculo u óvalo de 3 cm de largo por 1.5 cm de ancho, sin llegar a los bordes de la lámina para evitar que el operador se contamine al manipularla.
- ❖ Verificar que el extendido tenga grosor homogéneo y adecuado, si es demasiado fino, es posible producir un resultado falso negativo.

- ❖ Si es muy grueso, el material puede desprenderse durante la coloración o puede resultar difícil la visualización de bacilos debajo de una capa gruesa de mucus.¹⁷



Muestras de frótis. (1) Muy chico, (2) no uniforme y demasiado grande, (3) muy delgado, (4) muy grande, (5) mal decolorado y muy grueso, (6) tamaño y tinción adecuadas.

Figura 12

- ❖ Dejar el extendido en un soporte ubicado al costado de la mesa para que se seque a temperatura ambiente.
- ❖ Desechar el aplicador en un frasco que contenga una solución de hipoclorito de sodio al 1%; este frasco ira a la bolsa de patógenos.
- ❖ Cerrar el envase de la muestra con la que se realizó el extendido y dejarlo en el lado opuesto al lugar donde están los frascos con las muestras que aún no se han procesado, para evitar confusiones.
- ❖ Conservar las muestras hasta terminar las lecturas de la baciloscopía y verificar que no es necesario realizar nuevos extendidos o enviarlas para cultivo.
- ❖ Limpiar la superficie de trabajo con un papel adsorbente o algodón empapado en hipoclorito de sodio al 1%.
- ❖ Descartar los guantes desechables, junto con las muestras en el recipiente destinado a este fin esperar a que seque las láminas.¹⁸

PREPARACIÓN DEL EXTENDIDO








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

Figura 13



XI.- TINCION: TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

- ❖ Se tiene dos varillas de vidrio en forma paralela, a una distancia de aproximadamente 5 cm entre una y otra, dentro del lavado/pileta de coloración:

a) Colorante fucsina

- ❖ Filtrar la cantidad de fucsina necesaria para las tinciones a realizar en la jornada.
- ❖ Cubrir totalmente la superficie del extendido con fucsina básica fenicada recién filtrada. Dispensar el colorante con suavidad, sin salpicar y sin tocar con el gotero o con el embudo los extendidos.
- ❖ Con la llama de un mechero calentar suavemente por debajo de los extendidos, con movimientos de vaivén, hasta que observe que se desprenden los primeros vapores
- ❖ En caso de derrame del colorante, reponer la fucsina, no dejar secar el preparado.
- ❖ En el término de aproximadamente cinco minutos calentar tres veces hasta emisión de vapores; esto es suficiente para que la fucsina penetre adecuadamente en el bacilo y se fije a sus lípidos. **No hervir la fucsina porque la pared de los bacilos puede destruirse y colorearse mal.**
- ❖ Con una pinza, levantar cuidadosamente la lámina portaobjetos desde el extremo más cercano al operador. Enjuagar con abundante agua a baja presión, lavar muy suave y cuidadosamente la superficie eliminando totalmente la solución de fucsina.
- ❖ Inclinar el portaobjetos para eliminar el exceso de agua y así evitar diluir los reactivos que se utilizarán a continuación.



b) Decoloración

- ❖ Cubrir la totalidad del extendido con solución decolorante alcohol ácido y dejar actuar aproximadamente 3 minutos.
- ❖ Enjuagar con abundante agua a baja presión.
- ❖ Verificar que el extendido se ha decolorado (las partes más gruesas del extendido a lo sumo conservan un leve tinte rosado). Si se observan cúmulos rojos o coloración rosada intensa, volver a cubrir con solución decolorante, dejarla actuar entre uno y tres minutos y enjuagar nuevamente.
- ❖ Eliminar el exceso de agua inclinando el portaobjetos.

c) Coloración de fondo

- ❖ Cubrir todo el extendido con solución de azul de metileno.
- ❖ Dejar actuar durante un minuto, lavar y secar para observar.¹⁸

TÉCNICA DE ZIEHL NEELSEN

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

Figura 14



XII.- LECTURA DE EXTENDIDOS COLOREADOS POR ZIEHL NEELSEN

Para el examen microscópico es preciso contar con un microscopio y un área de observación apropiada. La lectura de los frótis debe ser de manera sistemática para asegurar que un área determinada se lea una sola vez.

a) Ubicar cerca del microscopio todos los elementos necesarios:

- ❖ Aceite de inmersión, papel suave.
- ❖ Registro del Laboratorio (anexo N°5) lapicera.
- ❖ Caja para guardar portaobjetos, frasco con xilol.
- ❖ Depositar una gota de aceite de inmersión en un extremo del frótis, sin tocar el preparado con el gotero.
- ❖ Enfocar el extendido donde se ha colocado el aceite, con el objetivo de 100x o de inmersión.
- ❖ Observar cada campo microscópico en superficie y profundidad, moviendo permanentemente el tornillo micrométrico, antes de desplazarse al campo contiguo.
- ❖ Seguir un recorrido en líneas rectas, sistemático para recorrer el extendido evitando repetir la lectura de algunos campos. Ej. de izquierda a derecha:

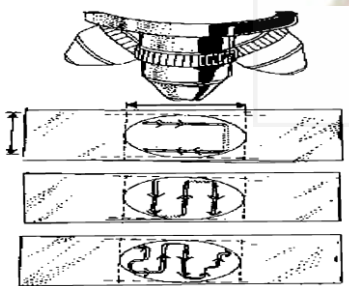


Figura 15

Ruta de examen de la laminilla para evitar examinar más de una vez un mismo campo.



- ❖ Si se observan cuerpos extraños que se mueven cuando se desplaza el portaobjetos, pueden ser restos de alimentos, precipitados o cristales. Si no se mueven, la suciedad o bacilos contaminantes puede estar en los objetivos, el condensador, el espejo o la fuente de iluminación; proceder a limpiarlos.
- ❖ Contar el número de campos que ha leído y el número de BAAR que ha identificado. (Descritos en la Tabla 2) se utiliza una cuadrícula de 10 cuadrados por 10 cuadrados, que representan los 100 campos microscópicos, como ayuda para registrar la cuenta. En cada cuadrado anotar el número de BAAR que se observa. Si no observa BAAR consignar 0 cero. El número total de campos a examinar depende de si se encuentran bacilos y en que concentración. Para informar negativo (-) se debe observar 300 campos microscópicos útiles.

Tabla N°2 Formato de registro de resultados por campo y ejemplo de datos consignados en el formato. Resultado: (No. de bacilos/No. de campos); Resultado: (49/100) Positivo

0	1	2	0	0	1	0	0	0	1
0	0	0	3	0	0	0	3	0	2
0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
1	2	0	1	0	0	0	1	0	0
1	2	0	1	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1	3	2	0	0	4	3	0	0	0
1	1	0	0	0	0	1	0	0	1



- ❖ Para calcular el promedio de BAAR encontrados por campo, sumar el total de BAAR contados y dividir ese total por el número de campos observados. Cuando los bacilos se presentan agrupados, una estimación aproximada del número de bacilos presentes en el cúmulo es suficiente para calcular este promedio.
- ❖ Los campos leídos deben ser “campos microscópicos útiles”. Se considera campo microscópico útil a aquel en el cual se observan células bronquiales, leucocitos, células ciliadas o fibras mucosas, que aparecen teñidos de azul. Los campos sin estos elementos no deben ser considerados para contar el total de campos observados, a menos que contengan BAAR.
- ❖ El extendido preparado tal como fue descrito permite observar 100 campos microscópicos en línea recta. Puede ser necesario leer una segunda línea para encontrar los 100 campos útiles.
- ❖ Al finalizar la lectura, girar el revólver de los objetivos y retirar el portaobjetos de la platina
- ❖ Verificar el número de identificación y anotar en el libro registros **N°5 (Anexos)** el resultado.
- ❖ Antes de examinar el siguiente frótis, limpiar suavemente el lente de inmersión con un trozo de papel absorbentes. Esto evita la transferencia de material al siguiente frótis que se va a leer.¹⁹

XIII.- INTERPRETACIÓN E INFORME DE RESULTADOS



Figura 16 a, Área de microscopía .Observación, Registro de resultados
Figura 16b campo observado

La observación microscópica debe establecer en primer lugar, la presencia de bacilos ácido alcohol resistente en el frótis en este caso, el número promedio aproximado observado por campo microscópico. Para los frótis teñidos por la técnica de Ziehl-Neelsen se recomienda utilizar la tabla N° 3 «La tabla para clasificar el resultado» y saber el número de campos que se deben examinar.

- ❖ Clasificar el resultado del frótis por número de cruces indica aproximadamente el tamaño de la lesión y la capacidad infectiva del paciente; además provee para la información epidemiológica y la evolución del tratamiento.
- ❖ Cada paciente diagnosticado como positivo deberá iniciar su tratamiento, el cual debe ser controlado mediante una baciloscopia mensual (el paciente debe traer cada mes la muestra de esputo al laboratorio para hacer el control). La baciloscopia debe ser negativa entre el 2^{do} y 3^{er} del tratamiento y continuar así hasta el final.
- ❖ Si la baciloscopia continua siendo positiva después del 3^{er} mes de tratamiento , se recomienda hacer un cultivo para confirmar el fracaso del tratamiento si los bacilos son viables y poder realizar la identificación de la especie micobacteria.¹⁹



TABLAN° 3 PARA CLASIFICAR EL RESULTADO

Negativo	No se observan bacilos ácido-alcohol resistente en 300 campos microscópicos.
De 1 a 9 BAAR* Positivo	Informar el número de bacilos en 100 campos observados
Positivo (+)	Más de 1a10 BAAR por campo en 50 campos observados.
Positivo (++)	10 a 99BAAR por campo en promedio en 20 campos
Positivo (+++)	Más de 10 BAAR por campo microscópico en 20 campos observados.

a) Registro de resultados

Todos los resultados de la lectura de la lámina deben anotarse en el libro de registro para la baciloscopia y luego se debe transcribir al formulario N°3 ver (**anexos**) para los resultados, anotando con bolígrafo rojo los resultados positivos y con negro o azul los resultados negativos.

La información del registro debe incluir: el número de laboratorio, el nombre del paciente, domicilio, sexo, edad, el nombre del centro de salud, señalar si se trata de frótis o muestra, tipo y calidad de la muestra, los resultados de la baciloscopia y las observaciones, si fuera necesario. Todos los resultados positivos deben ser escritos en el registro del laboratorio con bolígrafo rojo. Esto servirá para encontrarlos rápidamente. Registrar los resultados apropiadamente es tan importante como la tinción y la lectura correcta de un frótis por lo que se debe:



- ❖ Verificar que el número en la laminilla sea el mismo de la solicitud de examen.
- ❖ Colocar la fecha de reporte y anotar el nombre y firma de quien lo realizó.
- ❖ Es muy importante que los resultados no tarden más de un día, el tratamiento del paciente depende de ellos. Una demora reduce el valor de todo el trabajo que se ha hecho al examinar el frótis correctamente.
- ❖ No dar resultados únicamente al paciente.

b) Limpieza del microscopio

Al terminar la observación es indispensable limpiar el aceite de inmersión de los lentes con una franela embebida con alcohol. No usar bencina, acetona o thinner, estos solventes dañan los lentes objetivos. Si se tiene buen cuidado del microscopio durará por muchos años.

XIV.- CONSERVACIÓN DE BACILOSCOPIAS PARA SUPERVISIÓN.

a) Lavado.

Al terminar la lectura lavar los portaobjetos suavemente con xilol, (en un frasco solo por inmersión hacer esta operación 2 a 3 veces) dejar secar y colocarlos en una caja ordenada. Si no se lavan con xilol pueden pegarse por el aceite y será difícil que el supervisor pueda examinarlos y revisarlos posteriormente. Aunque el xilol no daña el frótis ni la tinción, no hay que lavar vigorosamente pues pueden desprenderse los frótis del portaobjetos.

b) Almacenamiento.

No debe desechar ningún frótis hasta que hayan sido examinadas por un supervisor. Mientras tanto deben conservarse en lugar seco o (refrigerador a 2 a 4 °C) ordenadas por



fecha, en una caja que impida la exposición a la luz y al polvo. La luz puede producir pérdida del color rojo de los bacilos teñido; el polvo puede dificultar la lectura.

c) Portaobjetos nuevos.

Para hacer una baciloscopía es indispensable que los portaobjetos sean siempre nuevos.

d) Eliminación de portaobjetos

Los portaobjetos que ya han sido sometidos a supervisión deben ser colocados en un envase para vidrio (contenedor de materiales punzocortantes), para posteriormente ser esterilizados y desechados.¹⁸

XV.- CAUSAS DE ERROR EN LA BACILOSCOPIA.

a) Relacionadas con la muestra.

- ❖ Muestra inadecuada, en calidad o volumen.
- ❖ Muestra recogida en un momento inadecuado (ej. después de comidas)
- ❖ Muestra mal conservadas (licuefacción de la partícula útil, bacteriolisis).
- ❖ Falta de cuidado al etiquetar el frasco: la etiqueta debe ser colocada sobre el cuerpo del frasco, no sobre la tapa.

b) Relacionadas con la preparación del frótis.

- ❖ No tomar la porción mucopurulenta de la muestra al realizar el frótis.
- ❖ Tomar poca cantidad de muestra para hacer el extendido.
- ❖ Preparar demasiados frótis a la vez: el máximo recomendado es de 12 muestras.
- ❖ Muestras contaminadas por el manejo inadecuado de aplicadores de madera.
- ❖ Área de trabajo insuficiente.
- ❖ Mezclar las laminillas.



c) Relacionadas con la tinción

- ❖ Uso de portaobjetos rayados: los depósitos de colorante en las hendiduras pueden confundirse con bacilos.
- ❖ Uso de carbol-fucsina sin filtrar: puede contener cristales o colorante precipitado.
- ❖ Descuido al calentar la carbol-fucsina: el secado excesivo o la ebullición produce formación de cristales en el frótiis.
- ❖ Inadecuada decoloración del frótiis: el lavado insuficiente puede dejar teñidos bacilos saprófitos que se confundirán con bacilos ácido-alcohol resistente.

d) Relacionados con la lectura

- ❖ Lectura de un número de campos menor de lo indicado.
- ❖ Falta de habilidad para distinguir los bacilos de los artefactos de la tinción.
- ❖ No verificar el número del portaobjetos.
- ❖ No volver a rotularlo si el número se oscurece o desaparece durante la tinción: esto puede llevar a confundir o sustituir un frótiis por otro.
- ❖ Rotulado poco claro o ilegible.
- ❖ Limpieza inadecuada u omisión de ésta, del objetivo de 100x después de cada lectura, especialmente cuando se han examinado frótiis positivos.
- ❖ Presencia de bacilos en el aceite de inmersión, causado por el contacto entre el frótiis y la boca del frasco del aceite: debe utilizarse un gotero y dejar caer la gota evitando el contacto con el frótiis.
- ❖ Registro equivocado de los resultados. ¹⁹



e) Mantenimiento del Microscopio

- ❖ El microscopio es un instrumento de precisión y requiere de un cuidado y mantenimiento del sistema óptico y mecánico. Los que procesan las muestras deben estar familiarizados con sus componentes, su funcionamiento en general y cuidados básicos del equipo.

f) Cuidados Básicos.

- ❖ Mantener el microscopio en su caja o con una cubierta que lo proteja del polvo cuando no esté en uso.
- ❖ Evitar exponer el microscopio a la humedad. Esta provoca el desarrollo de hongos en los lentes y causa oxidación en los componentes metálicos. Para limitar la exposición a la humedad colocar (Ej. caja de petri) que contenga sílica gel, en la caja del microscopio o donde quiera que el microscopio se guarde. Cuando la sílica gel ha absorbido mucha humedad Cambia de color (del azul al rosa), en tal situación la sílica gel debe ser reemplazada o deshidratada en un horno de aire caliente y rehusada cuando recobre su color original.
- ❖ Evitar guardar el microscopio en un lugar donde haya reactivos químicos, agua o vapores de gases corrosivos.
- ❖ El microscopio debe ser levantado o cargado con las dos manos: una sujetando el brazo firmemente y la otra bajo la base para proporcionar soporte adicional. No mover el microscopio con una sola mano.



- ❖ Instalar el microscopio en una superficie nivelada y resistente: no colocar equipos o instrumentos cercanos, que generen vibraciones (Ej. centrifugas) en la misma mesa.
- ❖ Si el microscopio va a ser usado diariamente no se debe mover del sitio donde está instalado, pero cuando no se use debe estar con una cubierta de polietileno o plástico para evitar que los lentes se rayen debido a la presencia de polvo o arena en sus superficies.
- ❖ Limpiar los lentes con papel de absorbente o un hisopo de algodón ligeramente humedecido con alcohol.¹⁹

g) Mantenimiento Mensual (limpieza más minuciosa y cuidadosa):

- ❖ Usar una brocha de aire para quitar el polvo. Limpiar los lentes objetivos, oculares y el condensador con papel suave y/o un hisopo de algodón ligeramente humedecido con alcohol.
- ❖ Quitar el carro de la platina y limpiarlo.¹⁹

h) Sistema de registros

El registro del laboratorio no sólo sirve para documentar los resultados del examen microscópico de las muestras. Si no para el control de la tuberculosis y para planificar futuras actividades. El laboratorio debe poder rastrear en sus registros las muestras recibidas, procesadas y derivadas para cultivo y prueba de sensibilidad, casos diagnosticados y controlados, el resultado de las baciloscopias de cada paciente.



XVI.- CONTROL DE CALIDAD

El control de calidad permite evaluar si la información producida por el laboratorio es precisa, reproducible y oportuna. Instauro un sistema de alarmas que permite prevenir, descubrir y corregir errores.

Resulta más eficaz para detectar y asistir a los casos de tuberculosis y para controlar la enfermedad.

El control de calidad es un procedimiento que emprenden en conjunto los distintos niveles de la red de laboratorios y tiene como objetivo a elevar y mantener la calidad de trabajo. No tiene carácter punitivo (aplicación de sanciones).

a) Control de calidad interno

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

Es un sistema concebido para mejorar la fiabilidad y la eficacia de los servicios de laboratorio de manera continua, comprende el control de calidad interno.¹⁸

El control de calidad interno comprende.

Control de calidad del microscopio

- ❖ Limpieza
- ❖ Lentes y oculares (limpios y sin daño)
- ❖ Verificar la utilidad del microscopio (observar láminas)
- ❖ Verificar la parte mecánica del microscopio (platina y fuente de luz y tornillos macro y micrométrico)



- ❖ Implementación de la ficha de mantenimiento en cada laboratorio.
- ❖ Ubicación del microscopio.

Control de calidad de colorantes

- ❖ Frascos (preferencia color ámbar) tapa hermética.
- ❖ Identificación correcta de los frascos.
- ❖ Almacenamiento de los frascos.
- ❖ Fecha de preparación de los reactivos
- ❖ Fecha de recepción y número de lote de reactivos (cuando el laboratorio recibe).
- ❖ Uso de fucsina filtrada una vez por semana y/o para cada uso.
- ❖ Prueba de coloración de colorantes preparados (teñir lamina positiva y negativa).

Control de calidad de la solicitud

- ❖ Uso del formulario N° 1. (anexo 2).
- ❖ Llenado adecuado y con claridad del formulario que consigne (fecha, de la solicitud, nombre, y apellidos, RAZÓN, edad y dirección)

Control de calidad del cuaderno de registro.

- ❖ Debe verificarse las hojas de registro llenadas el día en que se efectúa el control interno determinado por el responsable de calidad o responsable de laboratorio.
- ❖ Llenado de datos.
- ❖ Claridad de la letra.
- ❖ Uso adecuado de bolígrafos (negro y rojo).

Control de calidad de recepción.

- ❖ Bandeja con hipoclorito al 1 %



- ❖ Envase de recolección de muestra correctamente rotulado.
- ❖ Formulario N° 1 (anexo 2) solicitud de examen.

Control de calidad de la técnica.

- ❖ Calidad de láminas; limpieza y acondicionamiento.
- ❖ Identificación clara y legible.
- ❖ Expendido de 3 x 1.5 cm.
- ❖ Fijado.
- ❖ Coloración.
- ❖ Lectura.
- ❖ Registro del resultado en el libro de baciloscopías.

Control de calidad del reporte

- ❖ Llenado del reporte en formulario N°2 anexo 3 (completo y en forma clara).
- ❖ Fecha de reporte y firma.
- ❖ Entrega de resultados (registros de fecha y destinatario)



9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1.-

http://www.bbc.co.uk/mundo/ciencia_tecnologia/2010/03/100324_tuberculosis_resistencia_men.shtml

2.-. Tejerina M; Gonzales A; y Cuellar O; 2004 **BIOSEGURIDAD EN MEDICINA TRANSFUCIONAL** 1^{ra} ed. La Paz (Bolivia) 82 p.

3.-Programa de Bioseguridad, Departamento de Enfermedades Transmisibles (Vigilancia y Respuesta), 2005 OMS, Ginebra 27, Suiza (<http://www.who.int/csr/>).

4.-Resolución Ministerial N° 0131, 14 marzo 2002, **REGLAMENTO PARA LA GESTIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS GENERADOS EN ESTABLECIMIENTOS DE SALUD.**

5. -<http://www.eabolivia.com/social/739-bolivia-tercer-pais-con-altas-tasas-de-tuberculosis-en-america-latina-y-caribe.html>

6- Mostorino Elguera R., Rodríguez Gutarra M., Rosario Belleza F., Casquero Cavero J., Alba Ruiz F., Reyna Reátegui J. sub comité de bioseguridad del instituto. **MANUAL DE BIOSEGURIDAD PARA LOS LABORATORIOS** / Elaborado por Instituto Nacional de Salud. Sub Comité de Bioseguridad. 2a. ed. Perú — Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.80 p.: 30 cm. — (Serie de Normas Técnicas; 18)

7.-Aramayo S; Rodríguez S. y colaboradores 2010. Instituto Nacional de Laboratorios de Salud (INLASA) **REGLAMENTO PARA LA APLICACIÓN DE NORMA BOLIVIANA DE BIOSEGURIDAD EN ESTABLECIMIENTOS DE SALUD.** / Ministerio de Salud y Deportes; de Ed. No. 190. La Paz: Makro Producciones Gráficas, <http://www.sns.Gob.bo> Depósito legal.

8.- Registro general de Baciloscopias del Hospital Juan XXIII gestión 2011

9.- Caminero JA; Díaz F; Rodríguez de Castro F; et al. 2001 **EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD TUBERCULOSA EN LA ISLA DE GRAN CANARIA.** Med.Clin.vol.23 n.54

10.-Centro Panamericano de Zoonosis. Bacteriología de la Tuberculosis. La Organización de los Laboratorios.1987 **MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD**, Nota Técnica No. 29. Buenos Aires.



11.-Secretaría de Salud. Modificación a la **NORMA OFICIAL MEXICANA 2000, PARA LA PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN LA ATENCIÓN PRIMARIA A LA SALUD.** Diario Oficial de la Federación.

12.-EXPOSICIÓN A PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR LA SANGRE EN EL TRABAJO. Departamento del Trabajo de los EE.UU. Administración de la Salud y Seguridad Ocupacional. 2005.

13.-Calderón E.R; Asencio S.L; Quispe T.N; Custodio G.W; Montoya P.Y; 2009 **TRABAJOS ORIGINALES DETECCIÓN RÁPIDA DE RESISTENCIA A DROGAS EN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MEDIANTE PCR-SSCP Y PCR-HETERODUPLEX.** Lima- Perú. Rev. Perú Med. Exp Salud Pública.

14.-<http://www.bago.com/BagoArg/Instit/Novidades.asp> Productos\Evalúan **NUEVOS MÉTODOS DE PARA EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE TUBERCULOSIS.**mht

15.- Morán Moguel C; Aceves Hernández D; Peña Montes de Oca P; Gallegos Arreola M; Flores Martínez S; Montoya Fuentes H; Figuera L; Villa Manzanares L; Sánchez Corona J; 2000 **DETECCIÓN DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN UNA POBLACIÓN SELECCIONADA DEL NOROCCIDENTE DE MÉXICO.** Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am J PublicHealth7 (6), Guadalajara, Jalisco, México.

17.- Sequeira de LatiniM; BarreraL; 2008 **MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS: NORMAS Y GUÍA TÉCNICA— PARTE I:** Edi. Pan American Health Org, 64 páginas <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/tb-labsbaciloscopia.pdf>

18. - Camacho Prado M; Magne M; Mollinedo Martínez J; Calderón Villamil L; 2011 **MANUAL TÉCNICO DE LA RED DE LABORATORIOS DE TUBERCULOSIS (Baciloscopia)** Ministerio de Salud y Deportes. La paz N° 125 <http://www.sns.gov.bo>

19.-Carpio M; Hidalgo J; 2003 **MANUAL DE TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL EXAMEN BACILOSCÓPICO,** Primera Edición, México D. F.

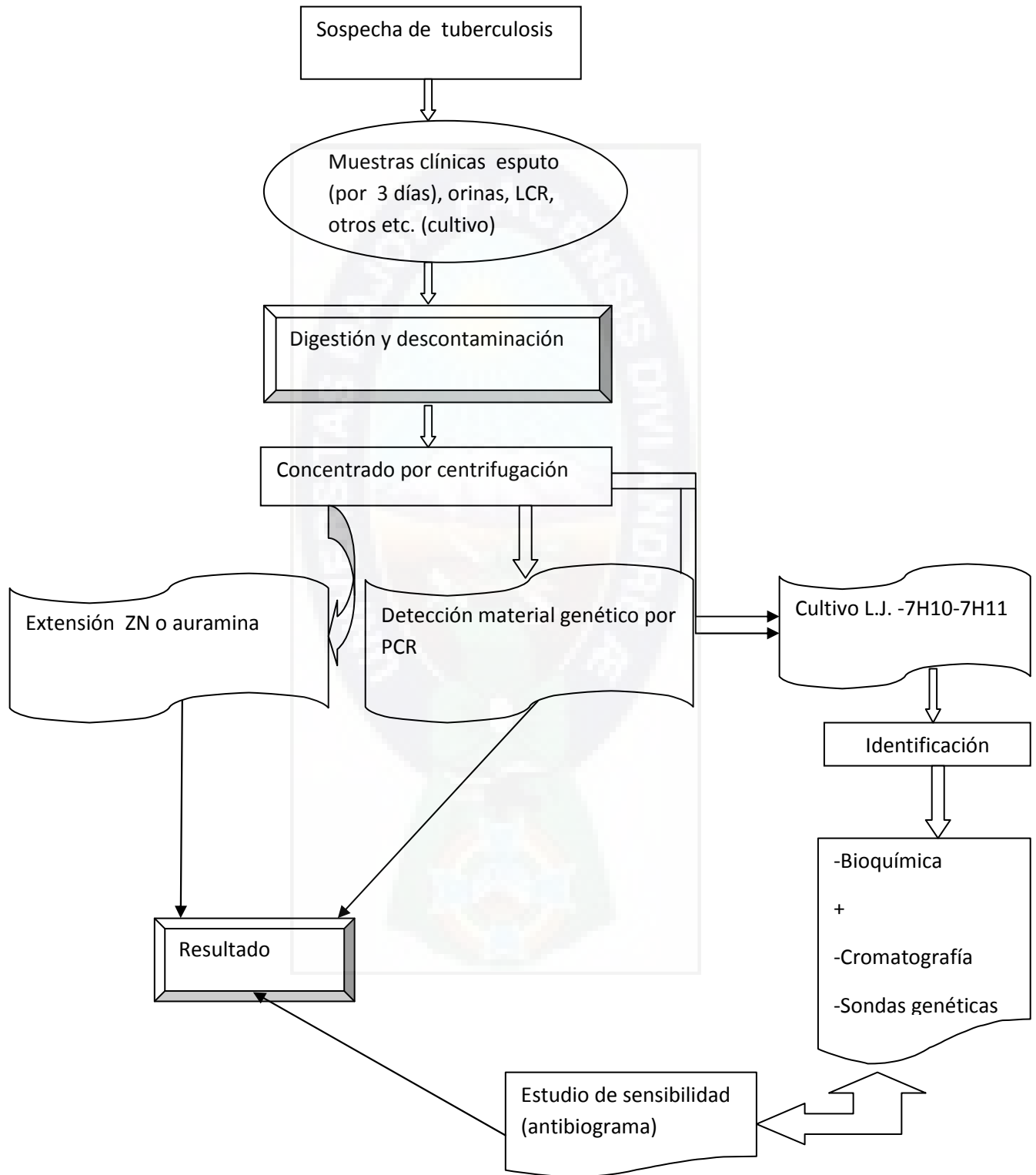
20.- MANUAL DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO. – 3a ed. Organización Mundial de la Salud. 2005 Se reservan todos los derechos.

AMEXOS



ANEXO 1

PERSONA SOSPECHOSA TUBERCULOSIS





FORMULARIO 1

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE TUBERCULOSIS
RED NACIONAL DE LABORATORIO DE TUBERCULOSIS
SOLICITUD DE EXAMEN BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS
(BACILOSCOPIA)

SEDES.....Establecimiento de salud solicitante.....

Nombres y Apellidos.....Edad Sexo M F

Dirección.....

Tipo de Muestra:

1. Expectoración

2. Otra Especificar Muestra.....

Razón del examen: Diagnóstico Control Mes de control.....

Fecha de recolección de la primera muestra:.....

Nombre y Apellidos de quien solicita el examen:.....

.....

Firma del solicitante

Fecha...../...../.....

ANEXO 3



FORMULARIO 2

MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES

**PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE TUBERCULOSIS
RED NACIONAL DE LABORATORIO DE TUBERCULOSIS
SOLICITUD DE EXAMEN BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS
(BACILOSCOPIA)**

Establecimiento de salud solicitante:.....

Nombres y apellidos del paciente.....

Nº de Registro de Laboratorio.....

Tipo de muestra 1. Expectoración 2. Otra Especificar muestra.....

FECHA	MUESTRA	CALIDAD DE LA MUESTRA	Neg.	RESULTADOS			
				1-9	+	++	+++
	1						
	2						
	3						
	Control						

Anotar NEG. Con azul o negro si la muestra es negativa

Anotar POS con rojo en casilla que corresponde a la lectura (1-9 BAAR,+, ++, +++)

Observaciones:.....Fecha...../...../.....

Examinado por (Nombre y firma):.....Laboratorio:.....

Una vez llenado este formulario (con el resultado) debe ser enviado inmediatamente al servicio solicitante



MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE TUBERCULOSIS RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE TUBERCULOSIS FORMULARIO DE SOLICITUD DE CULTIVOS PARA MYCOBACTERIAS

Sedes.....Servicio de salud solicitante:.....

Nombre y apellidos del paciente.....Edad Sexo

Dirección.....

TIPO DE MUESTRA

1. Expectoración

2. Otra Especificar muestra.....

RESULTADO DE BACILOSCOPIA: Positivo: Negativo:

RAZON DE LA SOLICITUD DEL EXAMEN:

1. Baciloscopia de esputo negativa con sospecha TB

2. otra muestra con sospecha de TB

3. Recaída

4. Fracaso Terapéutico

5. Abandono de tratamiento Especificar mes de Tto:.....

6. Sospecha de Resistencia Primaria

Fecha toma de muestra:.....

Nombre y Apellidos solicitante del examen:.....

Firma del solicitantes.....

ANEXO 5



**REGISTRO GENERAL BACILOSCOPIAS
MINISTERIO DE SALUD Y DEPORTES**

N° (1)	Fecha (2)	Nombre Y Apellidos (3)	Sexo F/M (4)	Edad (5)	Dirección Del Paciente (6)	CALIDAD Y RESULTADOS DE DIAGNÓSTICO											OBSERVACIONES (18)	
						1ª Muestra		2ª Muestra			3ª Muestra			CONTROL				
						Cal. (7)	Res. (8)	Fecha (9)	Cal. (10)	Res. (11)	Fecha (12)	Cal. (13)	Res. (14)	Mes Tto. (15)	Cal. (16)	Res. (17)		

Año.....

- Calidad de la muestra (cal.) S saliva
- P purulenta
- Mp Mucopurulenta
- SG sanguinolenta

ANEXO 6

REACTIVOS Y COLORANTES.

FUCSINA FENICADA	
Fucsina básica	3 g
Alcohol de 96°GL	100 ml
Disolver por agitación, agregar 55ml de fenol acuoso y dejar reposar 24 horas. Agitar y agregar agua destilada hasta completar 1000 ml, dejar reposar 24 horas y filtrar.	

SOLUCIÓN DECOLORANTE: (alcohol ácido).

SOLUCIÓN DE ALCOHOL ÁCIDO	
Ácido clorhídrico 37%	30 ml
Alcohol de 95°GL	970 ml
Dejar escurrir lentamente el ácido clorhídrico por las paredes del matraz que contiene el alcohol. Agitar suavemente	

AZUL DE METILENO	
Azul de metileno	1 g
Alcohol etílico 96°GL	100 ml
Agua destilada csp 1000 ml Disolver por agitación y filtrar.	