INSTITUTO
NACIONAL
DE SALUD

Serie Publicaciones Científicas, N° 1

Tuberculosis

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

RED
NACIONAL
DE
LABORATORIOS

Serie Publicaciones Científicas, Nº 1

Tuberculosis

LUIS CARLOS OROZCO VARGAS
OTILIA QUINTERO DE RAMOS
ISABEL ULLOA DE MORENO
ESNEDA GIRALDO DE BLANCO
CLARA INES LEON FRANCO
NANCY NARANJO LEAL
MAYE BERNAL RIVERA
MARTHA INIRIDA GUERRERO GUERRERO
DIANA MARINA CAMARGO LEMOS

SEGUNDA EDICION

Ministerio de Salud - Instituto Nacional de Salud - Bogotá, D.E., Colombia - 1987

Derechos reservados por el I.N.S. Prohibida toda reproducción parcial o total de este documento, sin previa autorización escrita de esta Institución.

Código Editorial ISBN - 958 - 13 - 0013 - 9

DR. MARIO OLARTE PERALTA
Director Instituto Nacional de Salud

DR. MAURICIO RESTREPO TRUJILLO
Director Laboratorio Nacional de Salud
"Samper Martínez"

EDITOR:

Dr. Gabriel Toro González

COMITE EDITORIAL:

Dr. Carlos Arturo Hernández
Dr. Moisés Wasserman
Dr. Gerzaín Rodríguez
Dr. Juan Manuel Renjifo
Dr. Francisco Carmona

CONTENIDO

Página

INTRODUCCION

El presente manual es una recopilación de las técnicas más comunes empleadas para el diagnóstico de las enfermedades causadas por micobacterias cultivables.

La metodología fundamental está basada en las recomendaciones dadas por la Comisión Latinoamericana de Bacteriología de la Tuberculosis COLABAT y en la experiencia acumulada por el Grupo de Tuberculosis que inició sus labores en el año 1962 y que fue fundado por el recientemente desaparecido doctor Guillermo Aparicio Jaramillo, además, por la obtenida durante los últimos 6 años, después de la fusión de dicho Grupo con el de Lepra de quien fuera jefe hasta su retiro el doctor Guillermo Muñóz Rivas, para dar orígen al actual Grupo de Micobacterias.

Todas las técnicas descritas en este manual han sido suficientemente corroboradas en nuestro laboratorio y pueden ser realizadas en los Laboratorios de la Red Nacional; sin embargo, sólo una supervisión y educación continuada permitirán un óptimo rendimiento en la aplicación de dichas técnicas.

Que éste manual sea la base fundamental de un mejoramiento progresivo del Programa Nacional de Control de la Tuberculosis.

OBJETIVOS DEL MANUAL

Uno de los principales objetivos del Programa de Control de la Tuberculosis es el descubrimiento de los casos y su adecuado tratamiento, con el fin de recuperarlos y convertirlos, lo más rápidamente posible en no contagiosos.

Desde este mismo punto de vista es papel esencial del laboratorio descubrir los enfermos que eliminan bacilos, hacer la evaluación periódica de la eficacia del tratamiento y orientar en la elección de los esquemas terapéuticos en cada región del país.

La necesidad de que los programas de tuberculosis lleguen no sólo a la población urbana, sino también a la intermedia y a la rural, han conducido a recomendar la integración de dichos programas a los servicios generales de salud; por consiguiente los laboratorios de todo nivel tienen que participar activamente en el desarrollo de este programa integrado.

La estandarización de las técnicas básicas de bacteriología de la tuberculosis tiene numerosas ventajas, hasta el punto de convertirse en una necesidad ineludible. Con la estandarización se puede obtener resultados comparables en toda la extensión del país, se facilita la capacitación del personal, la delegación de funciones y la adquisición de una serie de equipos, materiales y reactivos. Se posibilitan los cálculos de rendimiento, asi como el establecimiento de una adecuada supervisión.

Para que la estandarización de las técnicas sea útil, ellas deben ser adaptables a los diversos niveles de laboratorios del país. Deben ser sencillas para que por lo menos las básicas puedan ser manejadas por el personal auxiliar bien adiestrado y se pueda lograr con ellas una amplia cobertura.

El propósito fundamental de este manual es dar los principios generales, y los detalles de las técnicas basicas de bacteriología para poder proporcionar con seguridad y economía el máximo de ayuda posible en el diagnóstico, control y tratamiento de los casos de tuberculosis, de acuerdo con las condiciones existentes en el país, teniendo suficiente especificidad y sensibilidad como para dar resultados confiables.

Este manual está dirigido a todo el grupo profesional que trabaja en los programas de control de tuberculosis: epidemiólogos, médicos generales, bacteriólogos, personal de enfermería, auxiliares de laboratorio y promotoras de salud. Puede ser considerado como una guía de trabajo en lo que se refiere tanto a aspectos técnicos como operacionales.

I. FUNCIONES ESPECIFICAS DE LOS NIVELES EN LA ORGANIZACION DE LABORATORIOS

A. Laboratorio Central

Ubicado en la capital del país.

Actúa como Laboratorio de Referencia para todo el país.

Da pautas para establecer las normas sobre métodos y técnicas.

Constituye el Centro de Estudio de las resistencias primarias y secundarias desde el punto de vista epidemiológico.

Efectúa los estudios de sensibilidad de orden clínico y de identificación de cepas enviadas por los laboratorios del país.

Realiza investigaciones de orden técnico epidemiológico y operativo.

Capacita al personal nuevo y actualiza al antiguo en las técnicas de baciloscopia, cultivo y pruebas de identificación de *M. tuberculosis*.

Mantiene la coordinación con los Servicios Seccionales y Regionales.

Realiza la supervisión directa dos veces al año y la supervisión indirecta de conformidad con las necesidades de los Servicios Seccionales.

Asesora en la adquisición y distribución de reactivos y envases para recolección de muestras y otros materiales.

B. Laboratorios de Nivel Intermedio (Seccional)

Ubicados en capitales de departamento.

Efectúan baciloscopias y cultivos.

Capacitan al personal nuevo y actualiza al antiguo en técnicas de baciloscopia y cultivo.

Mantienen la coordinación de los laboratorios de la región.

Realizan supervisión directa tres o cuatro veces al año, e indirecta como mínimo en forma semestral y como máximo mensual.

Envían cultivos al Laboratorio Central para pruebas de sensibilidad o identificación.

Realizan algunas pruebas de identificación.

Recolectan la estadística de la Seccional.

Asesoran la distribución de reactivos y envases para recolección de muestras y otros materiales a los laboratorios locales.

C. Laboratorios de Nivel Regional y Local

Ubicados en hospitales, centros de salud y puestos de recolección de muestras.

Efectúan baciloscopias en los sitios que posean microscopio y envían las muestras para cultivo y pruebas de sensibilidad al al laboratorio del nivel intermedio.

Efectúa sólo extendidos, o extendidos y coloración de acuerdo con los recursos disponibles y los envían al laboratorio más cercano, para su lectura.

II. NORMAS DE SEGURIDAD

Como en muchos otros campos del trabajo médico y paramédico, en bacteriología de la tuberculosis, existe el riesgo de infección del personal, pero hay medidas para controlar este riesgo, en forma tal que las posibilidades de infección disminuyen considerablemente.

La vía más importante de infección en la tuberculosis es la respiratoria por inhalación de pequeñas partículas líquidas invisibles o aerosoles. Otra puerta de entrada es la vía oral debido al inadecuado uso de las pipetas o el hábito de comer o fumar dentro del laboratorio. Es posible también la infección por traumas con agujas u otros instrumentos.

Las medidas de seguridad tienen relación con el personal, con el área contaminada en que se trabaja, con el equipo de seguridad que debe ser utilizado, con la actitud a tomar al producirse un accidente y con las acciones a realizarse al terminar el trabajo.

2.1. Personal

El personal deberá recibir conocimiento sobre las medidas de seguridad personal y del Grupo con quien se trabaja.

Todo nuevo funcionario debe hacerse un estudio radiológico de tórax, controlarse anualmente y además aplicarse una prueba de tuberculina y vacunarse con BCG en caso de que la prueba sea negativa. (Menos de 9 mm de diámetro transverso de induración a las 72 horas).

2.2. Area contaminada

Como el riesgo principal en esta área es la inhalación de aerosoles, para evitar su producción debe ponerse especial cuidado en las siguientes etapas:

- Al destapar los envases con las muestras.
- Al preparar los extendidos.
- Al transvasar suspensiones bacilares por medio de pipetas.
- Al desechar líquidos sobrenadantes.
- Al agitar los tubos a mano o en agitador mecánico.
- Al abrir frascos o tubos después de centrifugar o agitar.

Además es importante:

- Evitar la entrada o tránsito de personas extrañas.
- Trabajar siempre con una bata larga de protección.
- Evitar el uso de joyas tales como anillos, pulseras, etc.
- Evitar que quienes trabajan en esta área salgan o entren contínuamente.
- No barrer ni encerar. Para la limpieza deben utilizarse traperos impregnados en desinfectantes tales como hipoclorito de sodio al 2.5% (blanqueadores de uso doméstico) o fenol al 5%.

2.3. Equipos de seguridad

- Mechero: debe ser colocado entre el operador y el material en proceso.
- Recipientes con embudo para evitar las salpicaduras, cuando se eliminan fluidos contaminados.
- En caso de trabajar con espátula metálica, utilizar un frasco con arena y desinfectante, para limpiarla y flamearla y cuando se usen espátulas de madera desechables, descartarlas en un frasco que contenga desinfectante.
- Recipiente cilíndrico suficientemente alto con algodón desinfectante destinado a las pipetas ya utilizadas.
- Peras de caucho para aspirar y vaciar líquidos con pipeta.
- Pipetas con filtro firme de algodón en el extremo superior.
- Autoclave para los laboratorios que hacen cultivos, para los que hacen sólo baciloscopia un recipiente adecuado para la incineración del material desechable.
- Cámara de seguridad con presión negativa para los laboratorios que puedan disponer de ella, haciéndose así una eliminación óptima de los aerosoles.

2.4. En caso de accidente

Caída y rotura de tubos, matraces, pipetas o envases con muestras. En estos casos se debe vaciar sobre el material quebrado y su área más próxima, un desinfectante adecuado como fenol al 5% o hipoclorito de sodio al 2.5%, cubriéndolo con un papel y dejando actuar el desinfectante durante media hora. Abandonar el laboratorio durante este tiempo.

Rotura de un tubo durante la centrifugación. No abrir la centrífuga durante media hora para que los aerosoles se sedimenten. Rociar con desinfectante la centrífuga y en especial el sitio donde se encuentra el tubo roto. Dejar actuar el desinfectante durante media hora y posteriormente retirar con pinzas los restos de vidrio.

Deglución de una suspensión bacilar por falla en el filtro de una pipeta. En este caso se exige tratamiento quimioterápico

2.5. Al término del trabajo

Se debe recoger todo el material utilizado, el material desechable y contaminado, se lleva a incinerar o al autoclave. El material no desechable debe ser esterilizado inmediatamente.

Limpiar la mesa de trabajo con una gasa o algodón humedecidos con desinfectante.

Lavarse cuidadosamente los antebrazos y manos con agua y jabón, cepillando especialmente las uñas y la parte inferior del dorso de la mano.

La llave del agua debe abrirse y cerrarse, haciendo uso de pequeños recortes de papel para no contaminarla.

III. BACILOSCOPIA (Bx)

Preferimos la abreviatura Bx. para baciloscopia y no la de BK que implica un epónimo (Bacilo de Koch), dado que con la baciloscopia (Bx.) solamente detectamos bacilos ácido alcohol resistentes (b.a.a.r.) y es igualmente válida tanto en tuberculosis como en lepra.

Es la búsqueda microscópica mediante la coloración de Ziehl Neelsen, de b.a.a.r. a partir de cualquier espécimen clínico. Este método diagnóstico es el más importante en tuberculosis sobre todo desde el punto de vista epidemiológico, porque el enfermo con baciloscopia de esputo positiva es la fuente más importante de contaminación para la comunidad.

3.1. Muestra de expectoración

La baciloscopia debe efectuarse a todo sintomático respiratorio, con más de 15 días de tos y expectoración.

La muestra ideal para la baciloscopia es la expectoración. Muestras que sean de saliva deben ser porcesadas, pero al paciente debe solicitársele nueva muestra. Para el diagnóstico se requieren tres muestras:

a. Se toma la primera muestra en el momento de la consulta y se solicita para el día siguiente (segunda muestra) el primer esputo que produzca al despertar; la tercera, al entregar la segunda.

b. En caso de que el paciente tenga dificultad para llevar las muestras en dos días diferentes,se puede entonces, durante el lapso de un día recoger las tres muestras.

3.2. Envase

El envase ideal debe ser desechable y de material plástico para favorecer la incineración, de boca ancha que permita a la persona depositar fácilmente la expectoración y al personal que efectúa el extendido, manipularlo fácilmente; con cierre hermético para evitar que se derrame.

3.3. Conservación de la muestra

El esputo puede permanecer máximo 24 horas a temperatura ambiente; si fuera necesario mantenerlo durante más tiempo antes de hacer el extendido, se conservará en nevera por una semana o a temperatura ambiente adicionándole igual cantidad de fosfato trisódico ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$) o ácido bórico al 1%.

3.4. Envío de la muestra

El organismo carente de microscopio puede enviar la muestra o el extendido fijado al nivel inmediatamente superior.

3.5. Técnica

3.5.1. Area de trabajo y material:

Todo laboratorio que realiza baciloscopia debe disponer de espacio adecuado que garantice una buena ventilación y entrada de sol.

3.5.2. Elementos necesarios:

Una mesa de trabajo.

Un lavaplatos con soporte o varillas para hacer la coloración.

Láminas portaobjeto nuevas, conservadas en un frasco con etanol al 70%.

Aplicadores de madera.

Mecheros de alcohol.

Lápiz graso (no rojo) para marcar vidrio.

Repisa doble o gradilla con capacidad para 12 láminas.

Tres frascos cuenta gotas, destinados a los colorantes: fucsina, azul de metileno y alcohol ácido.

Papel período para colocar en la mesa y luego incinerarlo.

Trozo de papel negro sobre el cual se colocan los recipientes con la muestra para observar mejor la partícula útil.

Una caneca o tarro metálico, amplio, con tapa, para desechar el material usado y contaminado como envases y aplicadores, que luego se deben quemar.

3.5.3. Preparación del extendido:

Toda el área de trabajo debe tener buena iluminación para realizar minuciosamente cada etapa.

Antes de empezar el trabajo los técnicos deben lavarse las manos y colocarse una bata de protección.

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

Es recomendable que cada serie de muestras a procesar no sea superior a 12. Las láminas deben ser nuevas y desengrasadas previamente. Si por escasez de láminas deben reutilizarse, se desechan las láminas positivas y las negativas ya muy rayadas que pueden ser utilizadas en otro tipo de examen y se emplean para un segundo extendido, las que hayan resultado negativas, previa limpieza.

Inmediatamente se recibe una muestra debe ser numerada en el cuerpo del envase, así como la orden correspondiente.

Las etapas de preparación del extendido son las siguientes:

1. Se coloca sobre la mesa de trabajo una hoja de papel periódico y ésta será el área contaminada, porque sobre ella se realizan las etapas más peligrosas de todo el procedimiento, desde la apertura del envase, la preparación del extendido, hasta desecharlo en el tarro metálico.

2. Se prepara la lista de trabajo con los nombres de las personas a quienes corresponden las muestras que se van a procesar, colocando al frente de cada una el número correlativo anual del laboratorio.

3. Colocar las 12 muestras sobre la mesa de trabajo en el área contaminada en línea horizontal, en el mismo orden de la lista.

4. Se toma la lámina portaobjetos y con un lápiz graso, se traza una línea que divide la superficie en una tercera parte destinada a la numeración y dos terceras partes para el extendido. El número debe hacerse por la cara inferior de la lámina, para evitar que se borre al hacer la tinción o coloración. Una vez numerada se coloca frente al envase correspondiente.

   Durante esta etapa se debe tener la precaución de no tocar con los dedos la parte de la lámina destinada al extendido porque puede engrasarse.

5. Se destapa solamente el envase de la muestra que se va a procesar, se coloca en el centro de la mesa de trabajo y cerca del mechero encendido, sobre el papel negro, junto a la lámina correspondiente, comprobando que ambos tengan el mismo número; se divide el bajalenguas o aplicador de madera en dos, utilizando la parte astillada para tomar la partícula útil, constituida por la parte purulenta de la muestra. Si se observan varias partículas purulentas se mezclan con los aplicadores y se toma una porción de la mezcla.

6. Se toma la lámina portaobjetos con los dedos índice y pulgar, en el 1/3 correspondiente al número. Se coloca la partícula útil sobre la lámina, cerca de la línea hecha

con el lápiz,se homogeniza la muestra extendiéndola hasta el extremo opuesto para lograr una película uniforme que cubra las dos tercerras partes de la lámina. Para que ésta película o placa sea realmente homogénea, es necesario tomar una partícula grande eliminando el sobrante con el mismo aplicador. Nunca debe calentarse mientras se está haciendo el extendido pues se forman círculos concéntricos y precipitados granulosos y la película pierde su homogeneidad.

7. Terminando el extendido se desechan los aplicadores en el tarro destinado a la incineración, se cierra el envase y se coloca en una segunda línea en el mismo orden de la línea de trabajo detrás de las que aún no se han procesado. Se pasan por la llama del mechero los bordes de la lámina portaobjetos y se colocan en la parte superior de la gradilla para que sequen a temperatura ambiente. Los envases con las muestras ya procesadas sólo deberán ser descartados después de la observación microscópica.

8. Una vez secos los extendidos se fija la lámina, pasándola rápidamente sobre la llama tres veces con el extendido hacia arriba.

9. Se colocan los extendidos en la parte inferior de la gradilla a medida que se van fijando (se desecha el papel contaminado y se lleva la gradilla con las láminas al sitio de coloración).

10. Al término del trabajo el papel negro, el usado en la gradilla y el que constituye el área contaminada, deben ser cuidadosamente descartados.

3.6. Coloración

La técnica aconsejada por la OPS/OMS es la de Ziehl Neelsen:

1. Se coloca la serie de láminas fijadas, conservando el órden numérico y colocando además un control positivo (vacuna BCG) y un control negativo (materia fecal), sobre las varillas de vidrio que están en el lavaplatos con el extendido hacia arriba, separadas unas de otras y con el número hacia el operador. Es conveniente que la varilla más cercana al operador esté ligeramente más alta que la otra; esta pequeña diferencia de nivel facilita el que los colorantes no se deslicen hacia la parte de la lámina destinada al número, evitando que éste se borre; además permite tomarlas entre el pulgar y el índice.

   Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con fucsina fenicada, previamente filtrada. Calentar suavemente con la llama, pasándola lentamente por debajo de las láminas portaobjetos hasta que produzca emisión de vapores; cuando éstos sean visibles, dejar de calentar. Al cesar la emisión de vapores, calentar nuevamente. Repetir esto una vez más hasta completar tres emisiones sucesivas. La fucsina no debe hervir y si disminuye por evaporación o derrame, hay que reponerlas porque el extendido debe estar cubierto constantemente durante el calentamiento. Esta fase no debe durar menos de cinco (5) minutos.

Eliminar el fucsina tomando el portaobjeto por el extremo numerado e inclinándolo hacia adelante y lavar dejando caer una corriente de agua a baja presión sobre la parte en que no hay extendido, la que escurrirá suavemente sobre la película.

2. Cubrir la totalidad de la superficie del extendido con alcohol ácido al 3%.

   Tomar la lámina entre el pulgar y el índice y hacer un movimiento de vaivén de modo que el alcohol vaya decolorando y a la vez arrastre la fucsina. Cuando el alcohol ácido adquiera coloración roja se elimina en la misma forma como se hizo con la fucsina y si el extendido conserva un tinte rosado en sus partes más gruesas, se decolora nuevamente.

   Se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas conservan sólo un ligero tinte rosado. Si las partes más densas quedan mal decoloradas, allí se podrán observar bacterias teñidas de color rojo que no son micobacterias.

   Una vez eliminado el alcohol ácido, lavar nuevamente las láminas en igual forma que después de la coloración con fucsina, cuidando de no desprender la película.

3. Coloración de contraste: cubrir la totalidad de la superficie del extendido con azul de metileno, el que deberá mantenerse no menos de dos minutos.

Lavar, procediendo en la forma que se indicó para la fucsina, tanto el extendido como la cara inferior del portaobjeto e ir colocando cada una con el extendido hacia arriba hasta que seque a la temperatura ambiente, conservando siempre el orden establecido.

3.7. Método de lectura

Una vez seca la lámina, se dejará caer una gota de aceite de inmersión, evitando tocar la lámina, en el centro del extendido a la línea divisoria y comenzar a leer la lámina, con objetivo de inmersión 90x ó 100x.

Al efectuar la lectura deben considerarse dos aspectos diferentes:

a. Recuento de gérmenes en cada campo microscópico: la lectura debe ser hecha siempre en igual forma de manera sistemática efectuando la búsqueda de gérmenes en cada campo microscópico, dividiéndolo mentalmente en cuatro cuadrantes, utilizando las cifras 12, 3, 6, 9 como en la esfera de un reloj. La búsqueda de bacilos debe hacerse en cada cuadrante en superficie y profundidad, valiéndose del tornillo micrométrico. Para separar un campo microscópico del próximo sin que queden superpuestos, el punto clave es la cifra 3, ya que cualquier estructura observada en ese lugar una célula, una fibra, un bacilo, etc., deberá quedar en el punto correspondiente a la cifra 9 del campo siguiente.

b. Recuento de gérmenes en un número determinado de campos microscópicos.

El número de campos que deberá observarse variará de acuerdo con la cantidad de bacilos ácido alcohol resistentes que la muestra contenga, lo que se hace evidente en la lectura de los primeros campos.

Si la muestra no contiene bacilos ácidos alcohol resistentes, es indispensable observar 600 campos, o no menos de 10 minutos.

Si la muestra contiene de uno a diez bacilos por campo, sólo será necesario observar cincuenta campos.

Si la muestra contiene más de diez bacilos por campo, será suficiente observar veinte campos.

Para facilitar lo anterior se utiliza una cuadrícula dividida en 100 cuadrados donde se anotan los bacilos observados por campo.

Al terminar la lectura de una lámina se debe limpiar el aceite de inmersión del objetivo, especialmente si la lámina ha sido positiva.

3.8. Informe de resultados

Escala de lectura semicuantitativa de la baciloscopia:

(-) : No se encuentran bacilos ácido-alcohol resistentes en más de CIEN campos microscópicos observados.

+ : Menos de UN bacilo ácido-alcohol resistente por campo en CIEN campos observados.

++ : UNO a DIEZ bacilos ácido-alcohol resistentes por campo en CINCUENTA campos observados.

+++ : Más de DIEZ bacilos ácido-alcohol resistentes por campo en VEINTE campos observados.

Al observar una muy baja positividad, es importante que el microscopista esté completamente seguro que la morfología presente corresponde a b.a.a.r., para informarla como Positiva +

Cuando se reciben muestras deficientes en calidad y cantidad, donde no se han encontrado bacilos, después de observar 600 campos microscópicos, se debe solicitar nueva muestra.

Modelo de formulario para solicitud de exámenes baciloscópicos, que servirá a la vez para el informe de resultados:

Nombre: _____

Establecimiento: _____

No. Historia Clínica: _____ Fecha: _____

Dirección del paciente: _____

Para diagnóstico:

Para Control:

Resultado: Positivo: Negativo:

Observaciones: _____

_____

_____

Fecha: _____

Laboratorista: _____

NOTA: Las láminas positivas deben ser conservadas en su totalidad así como el 10% de las negativas para la supervisión indirecta. Las láminas deben limpiarse con el fin de eliminar el aceite de inmersión, teniendo cuidado de no dañar el extendido y guardarlas separadamente una a una protegiéndolas del polvo.

PROGRAMA DE TUBERCULOSIS

Servicio Seccional de : _____

Municipio : _____

Laboratorio : _____

REGISTRO BACILOSCOPIA DIAGNOSTICO

FECHA	Nº DE REGISTRO	NOMBRE DEL PACIENTE	EDAD	PROCEDENCIA	BACILOSCOPIA			OBSERVACIONES
					1º	2º	3º	

PROGRAMA DE TUBERCULOSIS

Servicio Seccional de : _____

Municipio : _____

Laboratorio : _____

EVOLUCION BACTERIOLOGICA PACIENTES EN TRATAMIENTO

NOMBRE DEL PACIENTE	HISTORIA Nº	DIRECCION RESIDENCIA	Bx Dx	ENERO	FEB.	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOST.	SEP.	OCT.	NOV.	DIC.	ENERO	FEB.	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOST.	SEP.	OCT.	NOV.	DIC.	OBSERVACIONES

IV. COLORACION DE ZIEHL NEELSEN

4.1. Preparación de reactivos

4.1.1. Fucsina fenicada de Ziehl

Solución madre de fucsina:

- Fucsina básica	10 g.
- Etanol de 95°	100 ml.

Triturar la fucsina en un mortero, agregando el alcohol poco a poco; transvasar a un frasco oscuro, en caso de no poseer un mortero, mezclar la fucsina con el alcohol directamente al frasco. Agitar diariamente durante ocho días; con esto se busca extraer la mayor cantidad posible de colorante, del polvo de fucsina. A este procedimiento se le denomina "maduración del colorante", rotular "Solución madre de fucsina".

Solución de fenol al 5%:

- Fenol	5 ml.
- Agua destilada	95 ml.

Colocar cristales del fenol en un tubo de ensayo grande o vaso de precipitado para llevarlos a baño de maría hasta que se fundan. Medir 5 ml. con pipeta y completar a 100 con agua destilada.

Solución de trabajo de fucsina:

- Solución madre (filtrada)	10 ml.
- Solución de fenol al 5%	90 ml.

Envasar en frasco oscuro y rotular "solución de trabajo de fucsina".

4.1.2. Azul de metileno

Solución madre de azul de metileno:

- Azul de metileno	10 g.
- Etanol de 95°	100 ml.

Se prepara en la misma forma que la solución madre de fucsina, dejándolo madurar durante ocho días y rotular "solución madre de azul de metileno".

Solución de trabajo:

- Solución madre (filtrada)	30 ml.
- Agua destilada	70 ml.

Envasar en frasco oscuro y rotular "solución de trabajo de azul de metileno".

4.1.3. Alcohol ácido al 3%

- Acido clorhídrico	3 ml.
- Etanol de 95°	97 ml.

Agregar el ácido sobre el alcohol lentamente, envasar en frasco oscuro o transparente y rotular "alcohol ácido".

V. MEDIOS DE CULTIVO

5.1. Medio de Ogawa, modificado por Kudoh (O-K).

5.1.1. Solución base

- Fosfato monopotásico p.a. (KH_2PO_4) 2.0 g.
- Citrato de magnesio ($C_6H_5O_7 Mg_3 . H_2O$) 0.1 g.*
- Glutamato de sodio ($C_5H_8NNaO_4 . H_2O$) 0.5 g.
- Agua destilada 100.0 ml.
- Calentar suavemente hasta disolver completamente
- Glicerol p.a. ($C_3H_8O_3$) 4.0 ml.
- Ajustar el pH a 5.3 con NaOH 1N o con
- HCl 1N según sea necesario.
- Esterilizar a 15 libras de presión y 120°C. por 30 minutos.

5.1.2.- Homogenizado de huevos 200.0 ml.

- Verde de malaquita al 2% (en H_2O destilada) 4.0 ml.**
- Filtrar por gasa***
- pH final 6.4
- Envasar en tubos 5-7 ml. según el tamaño del tubo
- Coagular a 80-85° C. por 45 minutos.

---

* Este componente no es esencial para la detección del *M. tuberculosis* pero mejora la viabilidad del microorganismo.

** No debe tener más de una semana de preparado.

*** La gasa se dobla en cuatro, se coloca dentro del embudo, se lleva a esterilizar y queda lista para usarse.

5.2. Medio de Stonebrink (para aislamiento de *M. bovis*).

5.2.1. Solución base

- Fosfato monopotásico anhidro p.a. (KH_2PO_4) 3.5 g.
- Fosfato de sodio ($HNa_2PO_4 . 2H_2O$) 2.0 g.
- Piruvato de sodio p.a. ($CH_3COCOONa$) 6.25 g.
- Agua destilada 500.0 ml.
- Calentar suavemente hasta disolución completa
- Esterilizar a 15 libras de presión y 120°C. por 20 minutos.

5.2.2. Homogenizado de huevos 1.000.0 ml.

- Verde de malaquita al 2% (en H_2O destilada) 20.0 ml.
- Filtrar por gasa
- pH. final 7.0
- Envasar en tubos de 5-7 ml. según el tamaño del tubo
- Coagular 80-85°C. por 45 minutos.

VI. HOMOGENIZADO DE LOS HUEVOS

Deben ser frescos (no tener más de una semana).

Deben ser suministrados por distribuidoras que cumplan todas las reglas sanitarias.

De no ser utilizados de inmediato, almacenarlos a 4°C.

6.1. Lavado de los huevos

- Colocarlos en un recipiente con agua jabonosa por 30 minutos.
- Limpiarlos cuidadosamente uno por uno con un cepillo suave o un trozo de gasa.
- Enjuagarlos muy bien con agua corriente.
- Colocarlos en alcohol de 70% por 15 minutos.

Este alcohol puede ser reenvasado para ser utilizado en nuevas oportunidades.

6.2. Homogenizado

Todo el material de vidrio utilizado durante este procedimiento, debe ser estéril.

Los huevos deben ser revisados uno, a uno, ya que para ser utilizados deben presentar una yema firme, redonda que no se aplaste ni se rompa. No presentar pintas de sangre ni embrión.

Para esto, se quiebra el huevo en un vaso pequeño estéril y si cumple estos requisitos se transvasa a una probeta graduada; se continúa en igual forma con los otros huevos, hasta completar el volúmen requerido.

Homogenizar los huevos por alguno de los siguientes procedimientos.

a. En la misma probeta, emulsionar con una varilla de vidrio que debe llevar en el extremo una manguera de caucho, más o menos de 10 centímetros; ésto con el objeto de no romper la probeta.

b. Agitarlo a mano en un balón que contenga perlas de vidrio.

c. Homogenizarlos en una licuadora o batidora caseras a baja velocidad.

Una vez homogenizados por cualquiera de los métodos anteriores, añadirlos a la base correspondiente según el medio que se vaya a preparar.

VII. DECONTAMINACION DE MUESTRAS

7.1. Técnica de Ogawa-Kudoh - preparación de reactivos.

7.1.1. Hidróxido de sodio 4%.

- Pesar 4 g. de lentejas de hidróxido de sodio p.a.
- Disolver en 60-80 ml. de agua destilada.
- Completar a 100 ml. con agua destilada.
- Esterilizar a 15 libras de presión y 120°C. por 20 minutos.

7.1.2. Fosfato trisódico 10%.

- Pesar 10 g. de $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ p.a.
- Disolver en 60-80 ml de agua destilada.
- Completar a 100 ml. con agua destilada.
- Esterilizar a 15 libras de presión y 120°C. por 20 minutos.

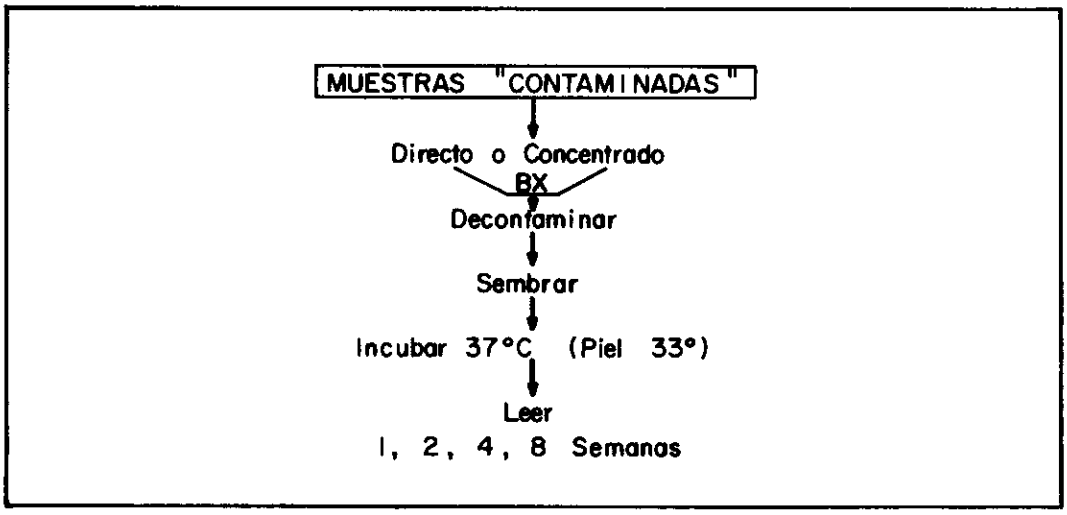
7.1.3. Fosfato trisódico 20%.

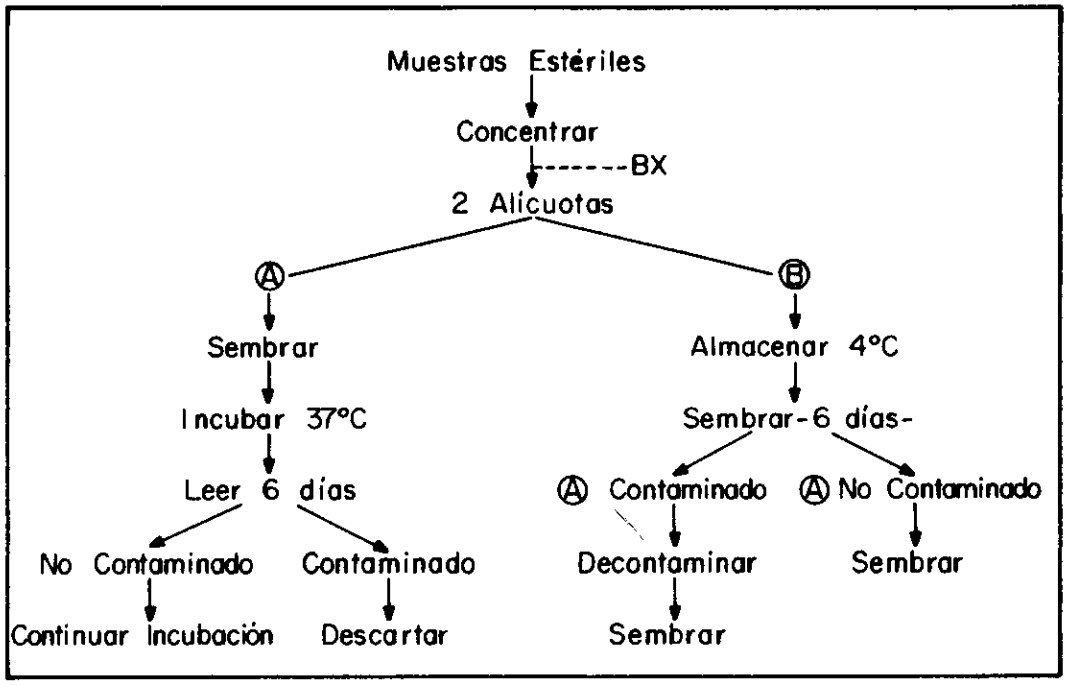
- Pesar 20 g. de $Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$ p.a.
- Disolver en 60-80 ml. de agua destilada. Calentar si es necesario.
- Completar a 100 ml. con agua destilada.
- Esterilizar a 15 libras de presión y 120°C por 20 minutos.

7.2. Técnica de Ogawa-Kudoh - procedimiento

- Impregnar la muestra a tratar en las partes laterales del algodón de un escobillón estéril.
- Introducir el escobillón en un tubo con NaOH 4% (cantidad suficiente para cubrir el algodón), durante 1-2 minutos (no soprepasar los 2 minutos).

- Llevar el escobillón a dos tubos con medio de O-K para la siembra, realizándose ésta con movimientos de rotación y presión.
- Llevar a incubar.





VIII. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS POR LA TECNICA DE OGAWA KUDOH

8.1. Esputo

- Tomar la partícula útil en las partes laterales del algodón de un escobillón estéril.
- Introducir el escobillón en un tubo con hidróxido de sodio al 4% (cantidad suficiente para cubrir el algodón), durante 1-2 minutos (no se deben sobrepasar los 2 minutos).
- Llevar el escobillón a 2 tubos con medio de Ogawa modificado por Kudoh (O-K), para la siembra, realizándose esta con movimientos de presión y rotación.
- Incubar a 37°C.

8.2. Orina*

- Solicitar la totalidad de la primera micción del paciente.
- Mezclar bien y tomar 30 ml. de orina.
- Adicionar 10 ml. de Na_3PO_4. 12 H 2O al 20%.
- Reposo durante 2 horas.
- Centrifugar a más de 3.500xg** durante 30 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Procesar el sedimento en la misma forma que se hace con el esputo.

8.3. Lesiones en piel

- Tomar cantidad suficiente de la secreción de la lesión en las partes laterales del algodón de un escobillón estéril.

---

* La muestra debe ser seriada en número no inferior a tres.

**O centrifugar al maximo de revoluciones de la centrífuga que se disponga.

- Continuar el mismo procedimiento utilizado para esputo.
- Incubar a 30-32°C.
- Tomar muestra de la secreción con otro escobillón para hacer extendido.

8.4. LCR

- Tomar líquido en cantidad no menor de 10 ml.
- Dividir la muestra en dos alícuotas.
- Llevar una alícuota a la nevera y procesar la otra:
- Centrifugar el LCR a más de 3.500xg durante 30 minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Sembrar directamente el sedimento con pipeta estéril en medio de O-K con y sin verde de malaquita.
- En caso de contaminación de esta alícuota, procesar la que se encuentra en la nevera asi:centrifugar durante 30 minutos, a más de 3.500 xg.
- Descartar el sobrenadante.
- Impregnar las partes laterales del algodón de un escobillón estéril con el sedimento.
- Introducir el escobillón en un tubo que contenga hidróxido de sodio al 4% (cantidad suficiente para cubrir el algodón), durante 1-2 minutos (no se deben sobrepasar los 2 minutos).
- Llevar el escobillón a 2 tubos con medio O-K para la siembra, realizándose esta con movimientos de rotación y presión.
- Incubar a 37°C.
- Hacer dos extendidos para baciloscopia.

8.5. Biopsias

- La muestra debe ser recogida en un recipiente estéril que contenga solución salina.
- En un mortero con arenilla y solución salina, se macera la muestra completamente.
- Se filtra a través de gasa estéril.

- Se reparte en dos alícuotas, una para procesarse por el método de Ogawa Kudoh y la segunda para guardarse a 4°C. y ser procesada en caso de contaminación de la otra.

- Centrifugar a más de 3.500 xg durante 30 minutos.

- Impregnar el escobillón con la muestra y llevarlo a un tubo con hidróxido de sodio al 4% (cantidad suficiente para cubrir el algodón) durante 1-2 minutos (no se deben sobrepasar los 2 minutos).

- Llevar el escobillón a 2 tubos con medio O-K para la siembra, realizándose esta con movimientos de rotación y presión.

- Incubar a 37°C. (piel 30-32°C.)

- Hacer dos extendidos para baciloscopia.

8.6. Sangre menstrual

- La muestra debe ser recogida en un tubo estéril que debe ser suministrado por el ginecólogo o directamente por el laboratorio.

- Debe ser tomada el primer día del período.

- Romper el coágulo.

- Dependiendo de la cantidad, procesar la muestra así:

a. Si la muestra es escasa, impregnar directamente el escobillón en ella y llevarlo a un tubo con hidróxido de sodio al 4% (cantidad suficiente para cubrir el algodón), durante 1-2 minutos (no se deben sobrepasar los 2 minutos).

- Llevar el escobillón a 2 tubos con medio O-K para la siembra, realizándose esta con movimientos de rotación y presión

- Incubar a 37°C.

- Hacer 2 extendidos para baciloscopia.

b. Si la muestra es abundante, concentrar por centrifugación y procesar el sedimento como se indicó en la parte a.

8.7. Líquido Seminal

- Recoger la muestra en un recipiente estéril.

- Repartirlo en dos alícuotas para guardar una a 4°C. y ser procesada en caso de contaminación de la otra.

- Seguir el mismo procedimiento utilizado en sangre menstrual.

8.8. Aspirado gástrico*

- Tomar una cantidad no inferior a 10 ml.
- Por cada 10 ml. de aspirado agregar 2 ml. de fosfato trisódico al 10%, inmediatamente después de recogida la muestra.
- Enviarlo al laboratorio, antes de 2 horas.
- Centrifugar a más de 3.500xg durante 30 minutos.**
- Descartar el sobrenadante.
- Decontaminar el sedimento por la técnica de O-K.
- Sembrar 2 tubos con medio O-K.
- Incubar a 37°C.
- Hacer 2 extendidos para baciloscopia.

8.9. Lectura e informe

Los tubos sembrados, se deben examinar por primera vez a los 6 días con el fin de descartar los que estén contaminados y si se hace necesario, pedir nuevas muestras.

En caso de que el crecimiento corresponda a b.a.a.r. se tratará de una micobacteria rápida crecedora, y deberá ser enviada al laboratorio de referencia para su identificación. Las revisiones posteriores se harán a las 4 y 8 semanas. Las colonias que se desarrollen deben ser verificadas haciendo un extendido y tiñéndolo con Ziehl-Neelsen.

El informe del cultivo debe ser semicuantitativo, para lo cual se recomienda la siguiente escala:

+++	colonias confluentes.
++	colonias separadas (más de 100).
+	20 - 100 colonias.
No. de colonias	Si hay menos de 20.
(-)	No se observan colonias.
Contaminado	Cuando el cultivo presenta contaminación.

Nota: solamente se podrá informar un cultivo positivo después de practicar la prueba de niacina, o nitratos y catalasas en su defecto.

---

* La muestra debe ser seriada, en número no inferior a tres.

**O centrifugar al máximo de revoluciones de la centrífuga que se disponga.

IX PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE MICOBACTERIAS

9.1. Niacina

Prueba de Konno

- A un cultivo de bacilos ácido alcohol resistentes abundante de más de cuatro semanas de desarrollo, adicionarle 1.5 ml. de agua destilada estéril.
- Darle golpes fuertes al tubo sobre la palma de la mano para permitir que el agua penetre al medio.
- Llevarlo a 37°C. durante 2 horas en posición horizontal
- Colocarlo a temperatura ambiente en posición vertical durante 10 minutos.
- Remover 0.5 ml. del extracto líquido a un tubo de ensayo.
- Adicionar 3 gotas de bromuro de cianógeno, con pipeta de 1 ml.
- Adicionar 3 gotas de anilina alcohólica al 4% con pipeta de 1 ml.

Interpretación:

- La aparición inmediata de un color amarillo indica que la prueba es positiva.

Controles:

- Control positivo: cultivo de *M. tuberculosis* de más de 4 semanas.
- Control negativo: cultivo de una cepa de micobacteria niacina negativa (*M. avium, M. fortitum).*
- Control reactivos: agua destilada estéril.

9.1.1. Preparación de reactivos

Bromuro de cianógeno* - se prepara a partir de:

- Agua de bromo.
- Cianuro de potasio.

*El bromuro de cianógeno es un gas lacrimógeno muy tóxico y en soluciones ácidas forma ácido hidrociánico. Por lo tanto, debe manejarse en cabinas de seguridad bien ventiladas y el material empleado se descartará en una solución alcalina de NaOH o NH_3. al 4%.

1. Agua de bromo:

- Colocar 30 ml. de agua destilada estéril en una probeta de 100 ml.
- Abrir una ampolla de bromo, depositarlo en la probeta.
- Completar con agua destilada a 100 ml.
- Conservarse en lugar fresco, protegido de la luz y lejos de los demás reactivos.

2. Cianuro de potasio:

- Pesar 10 g. de cianuro de potasio
- Añadir 100 ml.de agua destilada.

Se calcula la cantidad necesaria de bromuro de cianógeno para las pruebas a practicar, esta cantidad se toma de agua de bromo y se coloca en un tubo de ensayo con tapa de rosca, se va adicionando gota a gota al cianuro de potasio, hasta que la mezcla esté incolora.

3. Anilina alcohólica al 4%

- Tomar 4 ml. de anilina incolora (bidestilada)
- Agregar 96 ml. de etanol de 95°
- Conservar en frasco oscuro y protegido de la luz.

9.2. Tiras para la prueba de niacina

Estas tiras contienen los reactivos necesarios para la detección de producción de niacina en micobacterias.

- A un cultivo de bacilos ácido alcohol resistentes, abundante, de más de cuatro semanas de desarrollo, adicionarle 1.5 ml.de agua destilada estéril.
- Darle golpes fuertes al tubo sobre la palma de la mano para permitir que el agua penetre al medio.

  Llevarlo a 37°C. durante 2 horas en posición horizontal.
- Colocarlo a temperatura ambiente en posición vertical durante 10 minutos.
- Remover 0.5 ml. del líquido en un tubo de ensayo de 13 x 75 con tapón.
- Colocar una tira en la posición que indica la flecha, utilizando para esto una pinza.
- Tapar inmediatamente.
- Agitar suavemente.
- Dejarlo en posición vertical durante 20 minutos

Interpretación:

- La aparición de un color amarillo en el líquido, no en la tira, indica una prueba positiva.

Controles:

- Control positivo: los discos que vienen con las tiras o una cepa de *M. tuberculosis.*
- Control negativo: cultivo de una cepa de micobacteria niacina negativa (*M. avium, M. fortuitum).*
- Control reactivos: agua destilada estéril.

9.3. Reducción de nitratos

- Utilizar cultivos jóvenes.
- Para rápidos crecedores de dos semanas de desarrollo.
- Para lentos crecedores de cuatro semanas de desarrollo
- Colocar 0.5 ml. de agua destilada estéril en un tubo.
- Emulsionar una espatulada de colonias en el tubo anterior, aprox. 0.5 g.
- Añadir 2 ml. de substrato de nitratos (NaN03)
- Adicionar dos gotas de HCl 50% (V/V) y agitar.
- Incubar por 2 horas a 37 °C. (Baño de María o estufa).
- Agitar
- Añadir a cada tubo 2 gotas de solución de sulfanilamida al 0.2%.
- Agitar.
- Dejar en reposo durante 4 minutos
- Añadir a cada tubo 2 gotas de N-naphtiletilendiamina dihidrocloruro al 0.1%.

Interpretacion:

- La aparición de un color fucsia, el cual varía en intensidad, indica una reacción positiva.

Si no hay cambio de color, confirmar los resultados añadiendo a cada tubo negativo una pequeña cantidad de polvo de zinc. Si se desarrolla un color fucsia, confirma el resultado

negativo; si no ocurre cambio de color después de la adición del polvo de zinc, la reacción es positiva, por reducción de nitratos hasta amoniaco, repetir la prueba para confirmar el resultado.

Controles:

- Control positivo: cultivo de *M. tuberculosis.*
- Control negativo: cultivo de *M. bovis vr BCG.*
- Control reactivos: substrato.

9.3.1. Preparación de reactivos

Substrato de nitrato de sodio M/100 en buffer de fosfatos M/45, pH 7.0.

- $NaNO_3$ 0.085 g.
- KH_2P0_4 0.117 g.
- Na_2HP0_4 0.485 g.
- Agua destilada estéril 100.0 ml.

Acido clorhídrico al 50%

- Agua destilada estéril 2.0 ml.
- Acido clorhídrico 2.0 ml.
- (Siempre adicione el ácido al agua).

Sulfanilamida al 0.2%:

- Sulfanilamida 200.0 mg.
- Agua destilada estéril 100.0 ml.
- Disolver.

N-naphtiletilendiamina dihidrocloruro 0.1%

- N-naphtiletilendiamina dihidrocloruro 100.0 mg.
- Agua destilada estéril 100.0 ml.
- Disolver

9.4. Catalasas

- Colocar en 2 tubos 0.5 ml. de agua destilada estéril

- Emulsionar una espatulada de colonias de un cultivo de b.a.a.r. fresco, aproximadamente 0.5 g. de masa bacilar.

- Para rápidos crecedores de dos semanas de desarrollo

- Para lentos crecedores de cuatro semanas de desarrollo

9.4.1. Catalasa a temperatura ambiente.

- Tomar uno de los tubos anteriores.
- Adicionar 0.5 ml. de la mezcla de peróxido de hidrógeno y tween 80.
- No agitar para evitar la formación de burbujas no debidas a la actividad de catalasa.

Interpretación:

- El desprendimiento de burbujas indica una prueba positiva.

Controles:

- Control positivo: *M. tuberculosis*
- Control reactivos: agua destilada estéril

9.4.2. Catalasa 68°C.

- Tomar el otro tubo con la emulsión del cultivo.
- Llevar a 68°C. durante 20 minutos - EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA SON IMPORTANTES.
- Sacar el tubo y dejarlo enfriar hasta temperatura ambiente.
- Adicionarle 0.5 ml.de la mezcla de peróxido de hidrógeno y tween 80.

Interpretación:

- El desprendimiento de burbujas indica una reacción positiva
- No informar la reacción como negativa hasta transcurridos 20 minutos.

9.4.3 Preparación de reactivos

Mezcla de perhidrol al 30% - tween 80 al 10%

- Tween 80 10 ml.
- Adicionar agua caliente a 90°C 50 ml.
- Disolver completamente
- Completar con agua caliente hasta 100.0 ml.
- Esterilizar a 15 libras por 15 minutos.
- Mezclar volúmenes iguales de perhidrol al 30% con tween 80 al 10%.

9.4.4. Análisis de Resultados

Una prueba de niacina positiva indica que se trata de un *M. tuberculosis* en el 99.98% de los casos. Se tendrá en cuenta que micobacterias como el *M. bovis* var. BCG. cepa Tokio, empleada en nuestro medio durante algunos años en vacunación masiva, también presenta una prueba de niacina positiva, por lo cual, es importante conocer la clase de muestra de donde se aisló para someterla a pruebas de identificación.

En caso de no disponer de la técnica de niacina en el laboratorio, se pueden utilizar otras dos pruebas: la actividad de catalasas (T°A., 68°C.) y la reducción de nitratos.

ESPECIE	REDUCCION NITRATOS	CATALASAS	
		T°A.**	68°C.
M. tuberculosis	+	+	(-)
M. bovis *M. bovis var.** *BCG* *M. gastri*	(-)	+	(-)
Otras micobacterias	+ o (-)	+	+

* Variedad

**Temperatura ambiente.

NOTA: En caso de que el cultivo no corresponda a *M. tuberculosis,* deberá ser enviado al Laboratorio de Referencia para su identificación, anexando la correspondiente historia clínica e historia del cultivo.

X. NORMAS DE ENVIO DE CULTIVOS PARA PRUEBAS DE RESISTENCIA DEL M. TUBERCULOSIS A LAS DROGAS

Se han descrito diferentes métodos para demostrar la sensibilidad del *M. tuberculosis* a las drogas; en Colombia se ha venido utilizando desde hace 15 años el método de las proporciones en su variante simplificada.

Las pruebas de sensibilidad dentro de un Programa de Control de Tuberculosis tienen 4 aplicaciones que en su orden de prioridad son las siguientes:

1. Para propósitos científicos: permiten realizar estudios que contribuyen a la comprensión de los mecanismos de éxito o falla en la terapéutica.

2. Para estudios epidemiológicos: permiten comparar resistencia primaria en dos momentos diferentes en un país o comparar países entre sí.

3. Para la planeación de tratamientos con nuevos esquemas: se puede determinar el porcentaje de individuos inicialmente resistentes a una o varias drogas.

4. Para el paciente individual: con el objeto de seleccionar el régimen más efectivo, especialmente cuando se presenta la falla terapéutica en el re-tratamiento.

En Colombia solo se ha utilizado la prueba de resistencia para la última prioridad sin que hasta ahora se conozca la efectividad de dicho procedimiento en la selección de esquemas.

Un estudio reciente realizado por nosotros, tomando como base las pruebas de sensibilidad realizadas durante los últimos 11 años, demostró que la falla terapéutica en la mayoría de los casos no se debía a resistencia del *M. tuberculosis* a las drogas y que era posible que esta falla fuera debida a prescripción de regímenes inadecuados, irregularidad en la ingesta de las drogas, suspensión prematura del tratamiento o abandono por fenómenos tóxicos.

Otro estudio realizado en el Hospital La María de Medellín, demostró que más de la mitad de las pruebas de resistencia solicitadas(57%) no se justificaban.

Por lo anterior, las normas para solicitar una prueba de resistencia son:

a. El paciente debe haber fallado tanto en el tratamiento como en el re-tratamiento, es decir, que el paciente ha recibido uno de los dos esquemas de tratamiento inicial y uno de los dos esquemas de re-tratamiento.

b. Dado lo anterior, se debe hacer una siembra del esputo del paciente para obtener un cultivo primario, puro y abundante.

c. El cultivo debe tener entre 4-6 semanas y debe estar acompañado de un formulario con la historia baciloscópica y terapéutica completa del paciente, así como la historia del cultivo enviado.

Sin cumplir las tres condiciones anteriores, no se procesará ningún cultivo en el Laboratorio Central de Referencia.

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
GRUPO DE MICOBACTERIAS

SOLICITUD DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Institución solicitante _____ Fecha solicitud _____
Nombre del paciente _____ Edad _____ Sexo _____
Historia Clínica No. _____
Natural de _____ Procedente de _____

EVOLUCION			EVOLUCION		
FECHA	BACT.	TERAPEUTICA	FECHA	BACT.	TERAPEUTICA

INSALUD — 220

Historia cultivo enviado No. _____
Muestra procesada _____
Método de decontaminación _____
Fecha siembra _____
Lectura ( ) semanas ( ) colonias
Fecha envío _____
Practicar pruebas de sensibilidad a Streptomicina ☐ Isoniacida ☐ Thioacetazona ☐
Ethambutol ☐ Etionamida (Trecator) ☐ Rifampicina ☐

Firma _____

XI. ELIMINACION DE MUESTRAS

11.1. Esputos

- Llevar el esputo al autoclave a 15 libras por 20 minutos.
- En caso de no disponer de autoclave, se pueden utilizar otros procedimientos:

a. Incinerar el recipiente que lo contiene si esto lo permite.

b. Enterrar en un hueco profundo los recipientes y tapar con tierra.

11.2. Orinas

Sobrenadantes:

- Descartarlos en un frasco con un embudo (para evitar salpicaduras) que contenga un desinfectante.

Sedimento:

- Llevar los tubos con los sedimentos sobrantes al autoclave a 15 libras por 20 minutos.

11.3. Líquidos corporales, biopsias, sangres menstruales y otros.

- Los sobrantes y los sedimentos se eliminan en la misma forma que se hace con las orinas.
- El material utilizado para procesar las muestras debe ser llevado todo a esterilizar a 15 libras por 20 minutos.

XII. MANEJO DE MATERIAL

12.1. Material contaminado

Láminas:

- Conservar las positivas para b.a.a.r. para supervisión indirecta.
- El 90% de las negativas para b.a.a.r. descartarlas en hipoclorito de sodio al 2%.
- Llevarlas a ebullición en el hipoclorito de sodio por una hora:
- Retirarles el hipoclorito de sodio con abundante agua.
- Colocarlas en agua jabonosa.
- Retirarles el jabón con abundante agua una por una.
- Colocarlas en alcohol acetona.
- Secarlas.
- Colocarlas en las cajas para ser utilizadas en otras áreas del laboratorio.

Tubos de ensayo:

1. Tubos con medio de cultivo en los cuales se han sembrado muestras:

- Llevarlos a esterilizar a 15 libras por 20 minutos.
- Colocarlos en agua jabonosa.
- Remover el material grueso.
- Colocarlos en agua jabonosa.

- Restregarlos con churrusco.
- Retirarles el jabón con agua de chorro.
- Colocarlos en agua jabonosa.
- Retirar el jabón con suficiente agua pasándoles 4 veces el agua de chorro.
- Pasarlos por una solución de ácido clorhídrico al 1%.
- Pasarles agua destilada 4 veces.
- Dejar secar.

2. Tubos sin medio de cultivo:

- Llevarlos a esterilizar a 15 libras por 20 minutos.
- Colocarlos en agua jabonosa.
- Restregarlos con churrusco.
- Retirarles el jabón con abundante agua de chorro.
- Colocarlos en agua jabonosa.
- Retirarles el jabón con abundante agua pasándoles 4 veces agua de chorro.
- Pasarlos por una solución de ácido clorhídrico al 1%.
- Pasarles agua destilada.
- Dejarlos secar.

Pipetas:

- Descartarlas en una solución desinfectante como fenol al 5% o hipoclorito de sodio al 2%.
- Llevarlas a esterilizar a 15 libras por 20 minutos.
- Retirarles el algodón.

- Llevarlas a ebullición durante una hora en dextran o hipoclorito de sodio al 2%.
- Colocarlas en agua jabonosa.
- Restregarlas con churrusco.
- Eliminar el jabón con abundante agua de chorro.
- Pasarles una solución de ácido clorhídrico al 1%.
- Pasarles agua destilada 4 veces.
- Dejarlas secar.

12.2. **Material limpio**

Láminas:

- Colocarlas en agua jabonosa.
- Lavarlas una a una, eliminando muy bien el jabón.
- Colocarlas en alcohol-acetona.
- Secarlas.
- Colocarlas en sus cajas.

Tubos:

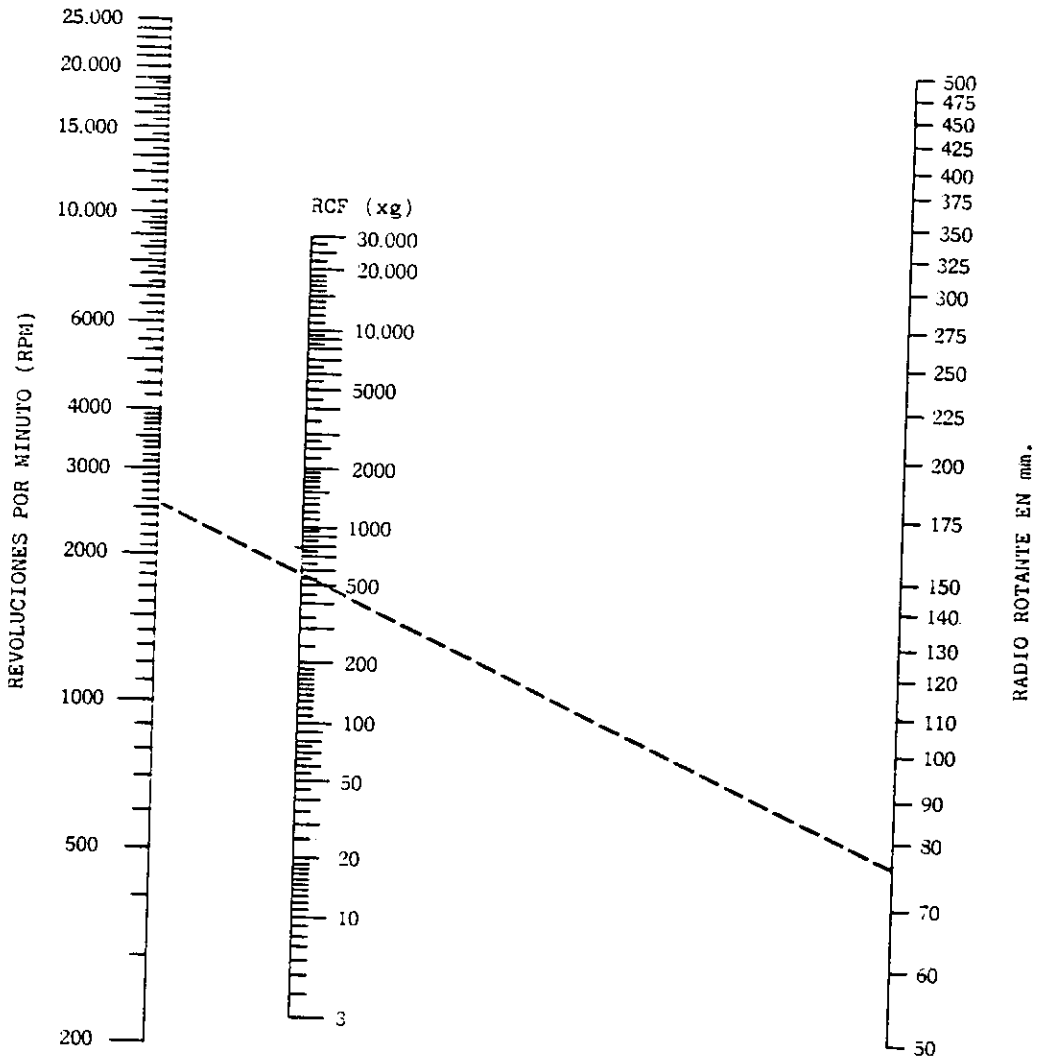
- Colocarles la tapa o taponarlos con algodón en rama.
- Llevarlos a esterilizar a 15 libras por 20 minutos.

Pipetas:

- Colocarles tapón de algodón.
- Envolverlas en papel milano, periódico o papel para envolver.
- Llevarlas a esterilizar a 15 libras por 20 minutos.

ANEXO I

NOMOGRAMA PARA CALCULAR LA FUERZA CENTRIFUGA RELATIVA (RCF) xg



El Nomograma esta basado en la fórmula R.C.F. = $11.18 \times 10^7 \times RN^2$

Donde R = Radio rotante en mm. medido desde el centro (eje) de la centrífuga hasta la mitad del líquido que se va a centrifugar.
N = Velocidad en revoluciones por minuto (RPM)

Para calcular las RPM que se necesitan para obtener una cierta fuerza centrífuga relativa (R.C.F.), medir el radio rotante y trazar una línea, desde esta medida, hasta la escala de RPM pasando por el valor de R.C.F. que se desea obtener.

Lo mismo se puede hacer para saber la R.C.F. que se obtiene, cuando se conocen el radio rotante y las revoluciones por minuto.

BIBLIOGRAFIA

1. Manual de Bacteriología de la Tuberculosis, Técnicas y Procedimientos Básicos. OMS/OPS, 1984.

2. Procedures for the isolation and identification of *Micobacterium tuberculosis*. Public Health Service. Center for Disease Control, 1985.

3. Orozco L.C., et al. Viabilidad del *M. tuberculosis* expuesto al fosfato trisódico en medio de Ogawa Kudoh a temperatura ambiente, 1983.

4. Orozco L.C., et al. El cultivo de esputo para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, Biomédica, 1985, 5: 24.

5. Orozco L.C., Una modificación al método de Ogawa Kudoh para el cultivo de tuberculosis pulmonar, Biomédica, 1985, 5: 3.

6. Blanco E. de, et al. Estandarización de una microtécnica de la aprueba de niacina. ICFES. Serie memorias de eventos científicos colombianos. XII Congreso Colombiano de Laboratortio Clínico y II Congreso Nacional de Colbasan, 1985: pág. 81.

7. Orozco L.C., et al. Diagnóstico Bacteriológico de la tuberculosis renal, op cit en ref. 6, pág. 82.

8. Orozco L.C., et al, Características de identificación del BCG, op cit en ref. 6, pág. 84.

9. Orozco L.C. et al. Viabilidad del *M. tuberculosis* expuesto al fosfato trisódico, op cit en ref. 6, pág. 87.

10. Guerrero M.I. et al. Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis infantil, op cit en ref. 6, pág. 92.

11. León C.I. et al. Efecto de algunos desinfectantes sobre el *M. tuberculosis*, op cit ref. 6, pág. 93.

12. Orozco L.C. et al. Nuestra experiencia con el método y medio de Ogawa-Kudoh en tuberculosis del adulto, op cit en ref. 6, pág. 95.