NORMAS Y GUÍA TÉCNICA

MANUAL

PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

PARTE 2 Cultivo

Organización Panamericana de la Salud
Oficina Regional de la Organización Mundial de

MANUAL PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

NORMAS Y GUÍA TÉCNICA

PARTE II CULTIVO

Organización Panamericana de la Salud

Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud

2008

Redacción
Lucia Barrera
INEI, ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Argentina

Revisión técnica

María Delfina Sequeira de Latini
INER, ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Argentina

Susana Balandrano
InDRE, México

Maritza Velazco
INS, Chile

Ernesto Montoro
IPK, Cuba

Revisión especial de expertos
Isabel Narvaiz de Kantor
Adalberto Laszlo

Agradecimientos
A María Alice Telles y María Consuelo Garzón Torres
Por las publicaciones que documentan la experiencia de Brasil y Colombia con el medio de cultivo Ogawa y el método de Kudoh.
A David Avendaño y Beatriz López por las fotografías

INDICE

PREFACIO 7

UTILIDAD DEL CULTIVO 9

ORGANIZACIÓN DE LOS SERVICIOS CULTIVO EN LA RED DE LABORATORIOS 11

EL BACILO DE LA TUBERCULOSIS Y OTRAS MICOBACTERIAS PRESENTES EN MUESTRAS CLÍNICAS DEL HOMBRE 13

FUNDAMENTOS DE LOS PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis* 17

Persistencia del bacilo en muestras de la lesión 17
Resistencia del bacilo a agentes decontaminantes 17
Concentración de los bacilos 18
Exigencias para el desarrollo del bacilo in vitro 18
Nutrientes en los medios de cultivo 18
Condiciones y tiempo de incubación 19
Contaminación cruzada 20
Cuantificación del desarrollo de M. Tuberculosis 20

ELECCIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO SEGÚN LOS RECURSOS DISPONIBLES 21
Método de Kudoh Ogawa 21
Método de Petroff 22
Métodos más costosos 23
Empleo de medios sintéticos 23
Sistemas para la lectura automatizada de cultivos 23

UBICACIÓN DE LAS TAREAS Y DE LOS EQUIPOS. FLUJO DEL MATERIAL 25
Tareas de muy bajo riesgo 25
Tareas de riesgo mediano 26
Tareas de mayor riesgo 26
El laboratorio de procesamiento de muestras y aislamientos 26
Área de esterilización de material contaminado 28
Escalamiento de la bioseguridad en las instalaciones de laboratorios de referencia con alto riesgo biológico 28

TOMA, RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS 31

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA EL CULTIVO DE MUESTRAS 33
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS 33
Entrenamiento del personal 33
Organización del material 33
Preparación de las muestras 35
Recuperación de material tomado por hisopado 36
Concentración de muestras líquidas o semifluídas 37
Maceración de muestras de tejido tomadas por biopsia 37
Eliminación de desinfectantes de muestras de esputo 38
Digestión, decontaminación, y concentración por el Método de Petroff modificado 38
Inoculación de los medios de cultivos y preparación del frotis 40
Organización del procesamiento simultáneo de distintos tipos de muestras 40
Acondicionamiento del material para el autoclavado 41
Incubación de los tubos inoculados 41
Fijación y tinción de los frotis 41
Decontaminación de áreas de trabajo y equipos 41
Lectura e informe de resultados de las baciloscopias 42
Otros métodos de decontaminación/homogenización 42
N-acetil-cisteina-hidroxido de sodio (NALC-NaOH) 42
Método de Kudoh Ogawa 42
Decontaminación con soluciones ácidas 43
Agregado de suplementos a los medios de cultivo 43
Incubación en condiciones especiales 43

LECTURA E INFORME DE RESULTADOS 50
Control visual periódico 50
Registro de resultados 51
Procedimientos especiales de lectura 51
Agar en placa delgada 51
Lectura manual de medios con sensores del desarrollo 51
Lectura automatizada de caldos 52
Procedimientos a seguir cuando se detecta desarrollo 52
Selección de cultivos positivos para identificación y prueba de sensibilidad 53
Informe de resultados 54
Descarte de tubos inoculados 54

IDENTIFICACIÓN DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* 55
Morfología de las colonias 55
Precauciones para procesar cultivos positivos 56
Características microscópicas 57
Pruebas bioquímicas 57
Prueba de niacina 57
Inhibición de catalasa a 68 °C 59
Reducción de nitrato 60
Pruebas moleculares 61

CONTROL DE CALIDAD 65
CONTROL DE CALIDAD INTERNO 65
Medios de cultivo, en particular a base de huevos 65
Aspecto 65
Sensibilidad 66
Esterilidad 66
Registro de elaboración o recepción, control y consumo de medios de cultivo 66
Organización del trabajo, calidad de los registros 66
Seguimiento de los resultados 67
Diario 67
Periódico 68
Relación entre resultados de baciloscopias y cultivos 68
Contaminación 69
Análisis de la demora en la entrega de informes 70
CONTROL DE CALIDAD EXTERNO. 70

BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA. 71

ANEXOS
ANEXO I. MEDIDAS MÍNIMAS DE BIOSEGURIDAD 73
Entrenamiento del personal 73
El laboratorio de cultivo de muestras 74
Indumentaria y equipo de protección del personal. 74
Operaciones dentro de una cabina de seguridad biológica 74
Precauciones generales para el procesamiento de las muestras. 76
Centrifugación 76
Procesamiento y desecho de material contaminado 76
Utilización de tubos que emiten luz UV. 77
Mantenimiento de refrigeradores 77
Plan de contingencia para accidentes de trabajo 78
Precauciones para la derivación de cultivos positivos a otro laboratorio 78
ANEXO II. EQUIPAMIENTO 81
Autoclave/estufa de esterilización 81
Homogeneizador o licuadora. 82
Bomba peristáltica 82
Coagulador 82
Centrifuga 82
Cabina de seguridad biológica 83
Incinerador de asas 85
Agitador de tubos tipo Vortex 85
Estufa de incubación 85
Baño María o bloque de calentamiento 85
Termómetros 85
ANEXO III. MATERIAL DE VIDRIO, PLÁSTICO Y OTROS 87
Pipetas 87

Dispositivos para pipetear 87
Morteros 88
Asas 88
Tubos o frascos para envasar los medios de cultivo a base de huevos 88
Tubos para centrifugar 88
Gradillas, cestos y bandejas 88
Recipientes para autoclavar material 88
ANEXO IV. PREPARACIÓN DE MATERIAL, MEDIOS Y REACTIVOS 89
Reciclado del material de vidrio o polipropileno 89
Solución de limpieza sulfocrómica 90
Precauciones generales para preparar soluciones 90
Conservación de medios y soluciones 90
Medios a base de huevos 91
Medios sintéticos de la serie Middlebrook 94
Caldo Middlebrook 7H9 94
Agar Middlebrook 7H11 94
Mezcla de antibióticos 95
Buffer fosfato pH 6,8 M/15 95
Soluciones decontaminantes 95
Hidróxido de sodio 4% para el Método de Petroff modificado 96
Solución decontaminante para el método NALC NaOH 96
Solución de cloruro de cetilpiridinio en cloruro de sodio, para el transporte de muestras durante un tiempo prolongado 96
Reactivos para la prueba de niacina 96
Bromuro de cianógeno 10 % 96
Cianuro de potasio al 4% 97
Agua de bromo 97
Anilina al 4% 97
Reactivos para la prueba de catalasa 97
Tubos con buffer pH 6,8 97
Tween 80 al 10% 97
Sustrato y reactivos para la prueba de nitrato reductasa 98
Sustrato 98
Reactivos 98
ANEXO V. MODELOS DE FORMULARIOS Y REGISTROS 99
Solicitud de baciloscopia, cultivo y prueba de sensibilidad 99
Resultado de baciloscopia, cultivo y resultado de identificación del aislamiento 100
Registro de resultados de identificación de aislamientos 102
Formulario para la derivación de un aislamiento o muestra al laboratorio (nacional) de referencia para identificación y/o prueba de sensibilidad 103
Registro de temperaturas 105
Registro de elaboración o recepción 106
Evaluación de resultados de cultivo 107

PREFACIO

Como fue presentado en la primera parte de este Manual, la baciloscopia es la técnica que soporta a las acciones de control de la tuberculosis. Con la baciloscopia el laboratorio inicia la investigación de una muestra de lesión del paciente en búsqueda del bacilo de la tuberculosis, detecta y evalúa la evolución de los casos infecciosos, pronostica y avala la curación de los que completan el esquema exitosamente e identifica a los que fracasan con su tratamiento

El cultivo complementa a la baciloscopia ya que permite poner en evidencia bacilos viables presentes en escasa cantidad en una muestra de lesión, caracterizarlos para certificar que sea el bacilo de la tuberculosis y conocer si es sensible o resistente a las drogas antituberculosas

Entonces, el rol del cultivo es más importante en escenarios con mediana o baja incidencia de tuberculosis, con alta coinfección del bacilo de la tuberculosis e HIV y con carga mediana o alta de tuberculosis multirresistente Se han desarrollado técnicas moleculares para lograr los mismos resultados del cultivo con mayor celeridad. Estos métodos aún no han logrado sustituir a la detección, identificación y prueba de sensibilidad dependientes del cultivo. El cultivo puede ser aplicado en laboratorios con medianos recursos y mantiene su posición como método de referencia por su precisión. Por otro lado, ningún método inmunológico ha logrado equiparar la especificidad del cultivo para detectar y confirmar el diagnóstico de la enfermedad causada por el bacilo de la tuberculosis De manera que, sobre la base de la evidencia producida hasta el momento, no es razonable introducir en los laboratorios de la red de diagnóstico de tuberculosis innovaciones, sin tener antes asegurada la cobertura y calidad con baciloscopia y cultivo.

Considerando la situación epidemiológica prevalente Latinoamérica, la experiencia desarrollada en la Región y los recursos existentes, es oportuno promover la valoración del cultivo como la herramienta del Programa de Control de Tuberculosis. El cultivo permite mejorar la evaluación de la eficiencia del Programa en la administración de tratamientos, optimizar el manejo de la tuberculosis multirresistente y la asociada a HIV, y progresar en el control de la enfermedad donde se han alcanzado los objetivos establecidos para los casos infecciosos.

El análisis de la situación también conduce a impulsar la garantía de calidad del cultivo y asegurar el acceso a esta técnica de los pacientes que pueden beneficiarse con ella.

Con esta visión se ha encarado la actualización de la normas para la identificación Mycobacterium tuberculosis mediante cultivo. Esta segunda parte del Manual de Bacteriología de la Tuberculosis está dedicada a laboratorios que previamente deben haber asegurado competencia, calidad y bioseguridad para realizar baciloscopia De manera que los procedimientos aquí presentados son adicionales a los descriptos para la realización de la baciloscopia en la primera parte del Manual.

Estas normas han tomado en cuenta las que las antecedieron en Latinoamérica (Notas Técnicas CEPANZO N° 26, 27, 28 y 29/1988) y las elaboradas por la Organización Mundial de la Salud (WHO/TB/98.258) y la experiencia de los laboratorios de la Región. Proponen mejorar la técnica puesta en vigencia por la norma anterior, y ofrecen un menú de métodos para distintos escenarios, seleccionados entre los que han demostrado aportar al diagnóstico de tuberculosis en Latinoamérica, según la evidencia publicada. Detallan además los procedimientos para incrementar la calidad y bioseguridad en el trabajo

UTILIDAD DEL CULTIVO

El cultivo produce resultados tardíamente pero es más sensible que la baciloscopia.

Puede evidenciar un mínimo de 10 a 100 bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) presentes en una muestra, si es realizado en forma adecuada.

Permite detectar los casos antes de que lleguen a ser infecciosos

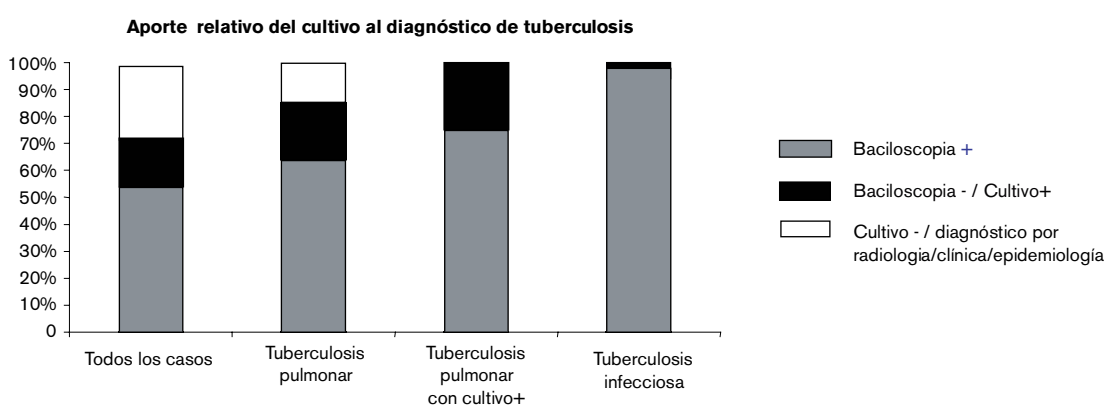
Mediante el cultivo es posible incrementar la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en aproximadamente 15-20% del total de casos y en 20-30% de los casos de tuberculosis pulmonar. Si se considera el total de casos con diagnóstico de tuberculosis pulmonar confirmado bacteriológicamente, la baciloscopia detecta el 70-80% y el cultivo 20-30% el restante. Estas cifras están condicionadas por la situación epidemiológica.

Entre los casos con tuberculosis extrapulmonar el aporte del cultivo al diagnóstico es muy variable según la localización de la patología.

Aun con un resultado negativo del cultivo es posible que se establezca o se mantenga el diagnóstico de tuberculosis sobre la base de las evidencias clínicas y epidemiológicas

Cuando es necesario priorizar el uso de recursos, el cultivo es reservado para los sintomáticos que no han podido ser diagnosticados por baciloscopia. Con este criterio, se siembran principalmente las muestras de sintomáticos adultos con enfermedad pulmonar poco avanzada, las de los niños y todas las muestras extrapulmonares.

En ciertas circunstancias, el cultivo permite dar seguridad al resultado de la baciloscopia positiva. Es el caso de materiales tomados con hisopos cuyas fibras de algodón pueden ser confundidas



con BAAR. O el caso de lavados broncoalveolares que pueden contener bacilos muertos que estaban en el instrumento utilizado para tomarlos.

Mediante el cultivo es posible aislar los BAAR presentes en una muestra en cantidad suficiente como para identificarlos por métodos bioquímicos, toda vez que sea necesario. Es preciso hacerlo cuando se procesan muestras provenientes de pacientes infectados por HIV que pueden estar afectados por tuberculosis pero también, con mayor frecuencia que los pacientes inmunocompetentes, por una micobacteriosis. También es necesario en el caso de muestras en las que puede haber micobacterias ambientales colonizantes (lavado gástrico, orina).

Por su sensibilidad y porque detecta únicamente bacilos vivos, el cultivo es el mejor método para demostrar la curación de un paciente al finalizar el esquema terapéutico. Sin embargo, es difícil asegurar el acceso al cultivo a todos los pacientes a los que se les da el alta, por lo que generalmente las normas requieren el simple control con una baciloscopia en favor de que puedan ser cumplidas, toda vez que la evolución clínica del paciente sea buena.

El cultivo permite realizar la prueba de sensibilidad a los antibióticos, identificar a los casos que necesitan una reformulación de la quimioterapia y orientar la conformación de un nuevo esquema de tratamiento. Para este fin, es necesario cultivar las muestras de pacientes que tienen riesgo de estar afectados por tuberculosis resistente al esquema estandarizado de primera línea. Son los pacientes que tienen antecedentes de tratamiento antituberculoso, sospecha de falla de tratamiento o de contagio con un bacilo resistente a las drogas.. El cultivo es el mejor método disponible para cerciorar falla de tratamiento. Para detectarlos, evitando demoras, se cultivan las muestras de casos bajo tratamiento con baciloscopia positiva al finalizar el segundo mes de quimioterapia, y se realiza la prueba de sensibilidad inmediatamente después de desarrollado el cultivo en el caso en que la baciloscopia persista positiva en el siguiente control.

Cuando se está realizando un estudio para evaluar la resistencia a drogas antituberculosas es necesario cultivar las muestras de los pacientes incluidos en la investigación según el protocolo de trabajo, aun cuando esto no sea requerido para el manejo clínico de los casos. Estos estudios son parte de la evaluación de las acciones del Programa de Control de Tuberculosis

Por ultimo, el cultivo es el método de referencia con el que se tiene que evaluar todo nuevo método diagnostico

USO SELECTIVO DEL CULTIVO

En el momento de diagnóstico

Cultivar todas las muestras de pacientes sintomáticos, con signos clínicos y/o radiografía u otras imágenes compatibles con tuberculosis y alguna de las siguientes características:

- baciloscopia negativa de 3 muestras respiratorias
- localización extrapulmonar de la enfermedad
- niños
- inmunosuprimidos, particularmente HIV positivos
- baciloscopia positiva en lavado gástrico, lavado bronquial o hisopados
- antecedentes de tratamiento antituberculoso, especialmente si se registró abandono o fracaso
- exposición a infección por bacilos resistentes a las drogas (contactos de casos con tuberculosis resistente, internados o trabajadores de instituciones de salud o de prisiones donde se registran casos con tuberculosis multirresistente)

DURANTE EL CONTROL DE TRATAMIENTO

Cultivar muestras de

- casos de tuberculosis crónicos o con baciloscopia positiva en el control del segundo mes de quimioterapia o en un control posterior
- casos diagnosticados con baciloscopia negativa y que convierten a positiva su baciloscopia durante el tratamiento

PARA LA VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA A DROGAS ANTITUBERCULOSAS

Cultivar las muestras de casos bajo estudio o vigilancia según lo establecido en el protocolo de trabajo

ORGANIZACIÓN DE LOS SERVICIOS DE CULTIVO EN LA RED DE LABORATORIOS

Requerimientos que limitan la implementación del cultivo a algunos laboratorios de la red

- Mayor dedicación del personal por cada muestra examinada
- Entrenamiento en prácticas de mayor riesgo biológico
- Equipos de mediano y alto costo con mantenimiento asegurado
- Laboratorio espacioso / con un sistema de direccionamiento y purificación de aire

El procesamiento de muestras para el cultivo involucra agitación, y en ocasiones la necesidad de manipular alto numero de bacilos multiplicados en el medio. Estas operaciones incrementan el riesgo y por lo tanto el laboratorio debe introducir medidas adicionales de protección de su personal.

Los mayores recursos necesarios para el cultivo determinan que en algunos países esté centralizado en uno o unos pocos laboratorios de referencia. Es conveniente impulsar un proceso de descentralización hacia laboratorios intermedios cuando el territorio es extenso, o la población es muy grande en ciertas áreas, o cuando existan barreras que dificultan o retardan la derivación de muestras. Según la Organización Mundial de la Salud es necesario al menos un laboratorio que realice cultivo por cada área con población de 500.000 habitantes.

Para que todos los pacientes que se puedan beneficiar con el cultivo tengan acceso a él, y para garantizar su calidad, es necesaria la participación de toda la red. Los laboratorios de las unidades de salud que realizan baciloscopia deben estar conectados con el laboratorio de la red más accesible que realice cultivo, si hay más de uno, y derivar a ese laboratorio las muestras que requieren ser cultivadas. A la vez, cuando el laboratorio que hace cultivo no tiene condiciones de seguridad suficiente para abrir y procesar cultivos positivos o no tiene implementada la prueba de sensibilidad, debe establecer la conexión con el laboratorio de referencia más accesible para derivar los aislamientos que requieran ser identificados o la prueba de sensibilidad.

La calidad del medio de cultivo es un punto crítico. Para elaborar los medios a base de huevo se requiere cierta infraestructura y personal dedicado a la preparación y control de calidad del medio. Por esta razón muchas veces es necesario y/o conveniente que los laboratorios de referencia de una jurisdicción y/o el nacional produzcan y provean esos medios a la red de laboratorios. En tal caso es necesario asegurar el transporte adecuado, y abastecimiento oportuno con medios de cultivo a los laboratorios

Si existen varios laboratorios intermedios en la red realizando cultivo, los laboratorios de referencia deben garantizar la calidad del cultivo en la jurisdicción a su cargo mediante controles de

calidad, entrenamiento y la implementación de medidas correctivas necesarias.

El nivel que asegura para el país la organización de red de laboratorios y la referencia técnica debe asegurar la calidad del cultivo y evaluar si la oferta, la utilización y el rendimiento del cultivo son adecuados en todo el país, en acuerdo con el plan de trabajo y objetivos del Programa de Control de Tuberculosis. Con este enfoque son varias las actividades que debe asumir este nivel:

- elaborar y difundir normas técnicas y operativas para la implementación del cultivo
- diseñar e implementar un programa de formación de recursos humanos que contemple al cultivo como herramienta de manejo de casos de tuberculosis
- implementar un programa de garantía de calidad del cultivo
- proveer a los laboratorios de referencia de las jurisdicciones herramientas para el entrenamiento y el control de calidad en cada área de trabajo
- promover la bioseguridad
- orientar e impulsar la inserción de adelantos técnicos con precisión demostrada donde sea posible y conveniente, asegurando para esto el entrenamiento necesario.

	Laboratorios			
Responsabilidad	**de referencia nacional**	**de referencia para una jurisdicción**	**intermedios**	**periféricos**
Organización de los servicios, evaluación de la oferta, utilización y rendimiento del cultivo	+	–	–	–
Provisión de normas de trabajo	+	–	–	–
Gestión de equipamiento y bioseguridad adecuada para cultivar muestras y derivar cultivos positivos	+	+	+	–
Entrenamiento y transferencia de de métodos	+	+	–	–
Garantía de calidad de cultivo	+	–/+	–	–
Provisión de medios	+	–/+	–	–
Preparación de medios	+	+	–/+	–
Cultivo de muestras	+/–	+	+	–
Selección y derivación de muestras que requieren ser cultivadas	–	–	–	+
Selección y derivación de aislamientos que requieren identificación/prueba de sensibilidad	–	–/+	–/+	–

EL BACILO DE LA TUBERCULOSIS Y OTRAS MICOBACTERIAS PRESENTES EN MUESTRAS CLÍNICAS DEL HOMBRE

El género *Mycobacterium* está integrado por cerca de 100 especies. Como fuera explicado en la primera parte de este Manual, tienen alto contenido de ácidos micólicos en su pared que retienen anilinas utilizadas como colorantes (fucsina, auramina) aun después de ser tratadas con alcohol-ácido. De manera que todas las especies se presentan como bacilos acido-alcohol resistentes (BAAR), y por lo tanto no es posible distinguir con certeza el bacilo de la tuberculosis de otras micobacterias por la baciloscopia.

La tuberculosis es la enfermedad más importante desde el punto de vista de salud pública entre las causadas por las micobacterias

***Mycobacterium tuberculosis* es el causante de la mayoría de los casos de tuberculosis en el hombre en el mundo entero**

El llamado complejo *M. tuberculosis* es un taxón continuo que comprende a varios agentes etiológicos de tuberculosis. *M. tuberculosis, M. africanum* que se presenta con variantes o subtipos regionales, y "*M. canetti*" (nombre propuesto para algunos aislamientos raros por sus colonias lisas y por algunos marcadores genéticos) son primariamente patógenos en el hombre. *M bovis y M microti* causan tuberculosis primariamente en animales. Algunos aislamientos peculiares hallados en cabras y focas o lobos marinos han sido llamados "*M. caprae*" y "*M. pinnipedii*"

Desde el punto de vista de la salud pública, *M. tuberculosis y M. africanum* son las especies de micobacterias más importantes porque son altamente patógenas para el hombre y muy transmisibles de individuo a individuo por medio de aerosoles expulsados por la tos de los pacientes con lesión pulmonar. Tal como su nombre lo indica, *M. africanum* es patógeno frecuente en el continente africano, aunque, obviamente su dispersión en otras áreas geográficas es posible de la mano de las corrientes migratorias.

M. bovis causa tuberculosis en el ganado bovino y en una gran variedad de animales salvajes y domésticos, eventualmente también en los que viven en zoológicos. Desde el animal, normalmente del bovino, puede ser transmitido al hombre. A pesar de que todavía existe una cantidad no desdeñable de rebaños infectados por este microorganismo en Latinoamérica, las medidas de sanidad animal y las aplicadas a los alimentos han llevado al descenso la incidencia de la zoonosis. En áreas ganaderas se puede esperar que *M bovis* cause a lo sumo el 1-2% del total de casos de tuberculosis con cultivo positivo. Afecta muy distintivamente a quienes están en contacto con el ganado (trabajadores rurales, de establecimientos que procesan carne para consumo, habitantes de áreas ganaderas).

M microti fue identificado como el causante de tuberculosis en roedores y en un numero muy limitado de mamíferos. Muy excepcionalmente se han descrito casos de enfermedad causada

por esta micobacteria en humanos que se sospecha adquirida desde los animales

La distinción de las especies del complejo *M tuberculosis* aporta información muy interesante desde el punto de vista epidemiológico, pero no es esencial para las actividades de control ni el manejo clínico de los casos, ya que responden a los esquemas de tratamiento de la tuberculosis estandarizados de primera línea, siempre que no hayan adquirido resistencia a estos fármacos.

El bacilo de Calmette y Guérin (BCG) utilizado como vacuna contra la tuberculosis, comparte la mayor parte de las características de *M bovis* del cual se supone que deriva, pero tiene virulencia atenuada. Puede ser aislado de muestras de lesiones originadas por alguna complicación de la vacuna, particularmente en niños. También a partir de muestras de pacientes con alguna complicación del tratamiento de cáncer de vejiga realizado con BCG.

M. leprae, causante de la lepra, no desarrolla en los medios de cultivo y no será considerado en este Manual.

El resto de las micobacterias, que también pueden ser detectadas en muestras tomadas del hombre, son capaces de vivir libremente y por eso son llamadas "ambientales". También se las conoce como "oportunistas" o "atípicas". Este último término fue inicialmente utilizado para agrupar las micobacterias que no se parecían al bacilo de la tuberculosis. Pero en realidad no son atípicas porque comparten todas las características que definen al género y la capacidad de vivir libremente no es excepcional entre las micobacterias.

Como el bacilo de la tuberculosis, las micobacterias ambientales pueden integrarse fácilmente en los aerosoles, pero en este caso son los que se generan por movimientos de agua y aire en la naturaleza. Los aerosoles son aspirados por el hombre y ésa es la vía por la que más frecuentemente lo infectan, aunque también lo pueden hacer por vía digestiva o penetrar por alguna lastimadura de la piel o heridas. Normalmente colonizan el árbol respiratorio o el tracto digestivo o urogenital sin causar daño alguno. Más aún, el encuentro puede ser inmunológicamente efectivo y conferir protección contra las especies de micobacterias altamente patógenas. Muy excepcionalmente un individuo inmunocompetente es vulnerado por estas micobacterias ambientales, el riesgo aumenta cuando ha sufrido enfermedades pulmonares crónicas (tuberculosis, enfermedad obstructiva crónica, asbestosis, silicosis, etc.). Las micobacterias ambientales tienen capacidad para subsistir en soluciones o instrumentos de uso hospitalario y prótesis, elementos que pueden ser vehículo de serias infecciones posquirúrgicas. No existe evidencia de que las micobacterias ambientales sean transmisibles de hombre a hombre.

Se aíslan micobacterias ambientales en 3-5% de las muestras de pacientes inmunocompetentes con cultivo positivo de BAAR, son más frecuentes en cultivos realizados en caldos enriquecidos, pero en su mayoría son insignificantes.

Las micobacterias ambientales son consideradas colonizantes banales o contaminantes agregados durante la toma o procesamiento de la muestra a menos que se reúna sólida evidencia que demuestre que están causando enfermedad.

En países con alta o mediana incidencia de tuberculosis, entre los enfermos inmunocompetentes con cultivo positivo de BAAR más del 99% son casos de tuberculosis. La enfermedad causada por micobacterias ambientales es más frecuente entre individuos inmunosuprimidos, como son los que padecen SIDA y tienen bajos niveles de linfocitos T. Cuando se administran esquemas de tratamiento anti-HIV de alta eficacia, los individuos que viven con este virus pueden recomponer su sistema inmune y la frecuencia de las micobacteriosis disminuye notoriamente.

El complejo de micobacterias oportunistas de mayor incidencia como patógeno es el integrado por *M. avium* y *M.intracellulare* (complejo MAI) y su localización más frecuente es la pulmonar. Siguen, en orden de frecuencia, algunas micobacterias de rápido desarrollo: comple-

jo *M fortuitum* (del que con métodos complementarios a los bioquímicos se puede distinguir *M fortuitum* y *M. peregrinum*), *M abscessus* y *M chelonae.* En algunas áreas geográficas se destaca la frecuencia de *M. kansasii* que es la más virulenta entre las micobacterias ambientales y la única que normalmente es sensible al esquema antituberculoso de primera línea. Otras micobacterias aparecen con mucha menor frecuencia

En los casos excepcionales en los que exista motivo para dudar si lo que se ha visto, por examen microscópico o en el medio de cultivo, pueda ser una micobacteria diferente al bacilo de la tuberculosis, es importante distinguir entre tuberculosis, micobacteriosis o presencia de una micobacteria banal. La distinción, debe ser realizada con la mayor celeridad posible, en especial si se está frente a un paciente comprometido (inmunosuprimido por efecto del HIV o corticoides, sometido a procedimientos quirúrgicos incluyendo transplantes, etc.). En estas situaciones se abren tres posibilidades frente al paciente:

- tratarlo por tuberculosis
- administrar tratamiento o quimioprofilaxis contra una micobacteriosis (con esquemas diferentes a los antituberculosos)
- no tratarlo

Si el paciente ya tiene quimioterapia instaurada, el resultado preciso del laboratorio orientará a mantener el esquema o modificar la conducta inicialmente adoptada

Por otra parte, si se diagnostica tuberculosis es necesario desencadenar el control de contactos y medidas para la contención de la transmisión de la enfermedad, actividades innecesarias en el caso de identificar una micobacteria ambiental.

FUNDAMENTOS DE LOS PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis*

Mediante el cultivo es posible hacer que los bacilos presentes en las muestras de los pacientes se multipliquen *in vitro,* hasta que se muestren formando colonias en un medio sólido, turbidez en un caldo o hasta que algún sensor incorporado en el medio cambie de color o emita fluorescencia cuando el bacilo consume O_2 o libera CO_2.

PERSISTENCIA DEL BACILO EN MUESTRAS DE LA LESIÓN

Las micobacterias ambientales pueden sobrevivir fuera del hospedador, si las condiciones no son extremas, pero los integrantes del complejo *M.tuberculosis* resisten menos fuera de él. De manera que la probabilidad de hacerlos reproducir en el cultivo aumenta con la rapidez con la que se siembre la muestra de la lesión del paciente. La demora es muy crítica cuando el número de bacilos es escaso o cuando el pH de la muestra es desfavorable para la sobrevivencia del bacilo, como en el caso de lavados gástricos y orinas. Aunque es desventajosa porque permite la reproducción de la flora contaminante, no es tan grave la postergación de la siembra de muestras de esputo que contienen alto número bacilos (baciloscopia positiva); con ellas se han obtenido cultivos positivos hasta 15 días después de la recolección

La luz solar, desecación y el calor son condiciones micobactericidas. En cambio, el bacilo resiste a temperaturas muy bajas y su viabilidad puede ser preservada durante plazos crecientes entre los 2-4 °C y -70 °C.

RESISTENCIA DEL BACILO A AGENTES DECONTAMINANTES

Comparado con otras bacterias que se reproducen en pocos minutos, todos los integrantes del complejo *M. tuberculosis*, y varias micobacterias ambientales proliferan muy lentamente. En condiciones favorables de laboratorio, el bacilo de la tuberculosis se divide cada 18 a 24 horas. Las secreciones del aparato respiratorio que han atravesado las vías altas, la orina que pasó por la uretra, las muestras del tracto digestivo y las lesiones superficiales de piel contienen flora habitual o contaminante que se multiplica cada 15-60 minutos. Por esta razón no es posible aislar al bacilo de la tuberculosis inoculando estas muestras directamente en placas con medios de cultivo y seleccionando colonias por su morfología. Con este procedimiento, los gérmenes comunes acompañantes ocupan el medio de cultivo en pocas horas impidiendo que aparezca el bacilo de la tuberculosis.

Las micobacterias pueden resistir a ciertos desinfectantes como el cloruro o bromuro de cetilpiridinio y el trifosfato de sodio que pueden ser utilizados para el trasporte de muestras durante

un tiempo prolongado. Por el contrario, son letales para el bacilo algunos conservantes como fenol, formol o de formaldehído, algunos son utilizados para investigaciones histológicas.

Si las muestras contienen gérmenes comunes y no han sido decontaminadas durante su transporte, se requiere un tratamiento especial para aislar el bacilo de la tuberculosis u otras micobacterias. Es necesario homogeneizar las muestras densas, como los esputos, y eliminar la flora acompañante mediante un proceso de decontaminación. Esto es realizado generalmente con una base fuerte como el hidróxido de sodio (NaOH).

El bacilo de la tuberculosis es más resistente que los gérmenes comunes al tratamiento con decontaminantes, pero una proporción no despreciable de BAAR muere durante el procedimiento, entre 30 y 60 % dependiendo del método. El efecto letal es mayor cuanto mayor es la concentración de la base y cuanto más prolongado es el tratamiento. De manera que es necesario ser preciso al preparar la solución decontaminante y al controlar el tiempo de contacto con ella para preservar la viabilidad del bacilo de la tuberculosis, tanto como sea posible. Se puede agregar un agente mucolítico como la n-acetil-L-cisteina (NALC) para disminuir la viscosidad del esputo y favorecer la penetración del decontaminante que puede entonces ser utilizado a menor concentración y durante menos tiempo. A la vez facilita la precipitación de los bacilos por centrifugación. El agregado de citrato de sodio en la mezcla decontaminante sirve para unir iones de metales pesados que pueden estar presentes en la muestra e inactivar al NALC. Es posible aumentar la recuperación de BAAR disminuyendo en primer lugar el tiempo de contacto con el decontaminante y luego la concentración de NaOH, siempre y cuando esto no resulte en un aumento del porcentaje de cultivos contaminados muy por encima del 4% que es el nivel considerado aceptable. Se puede considerar esta alternativa en laboratorios que procesan muy cuidadosamente y sin demoras las muestras el mismo día en que son tomadas.

Es preferible no decontaminar muestras de tejidos o líquidos normalmente estériles, para evitar el efecto deletéreo del procedimiento. Pero es necesario asegurar la esterilidad durante todos los procedimientos de toma y procesamiento de la muestra, de otra forma se perderá material muy valioso y de difícil obtención por contaminación del cultivo.

El bacilo de la tuberculosis sobrevive y se multiplica a un pH cercano al neutro. Para neutralizar la muestra decontaminada con hidróxido de sodio se puede agregar una solución ácida gota a gota hasta que vire un indicador de pH. Este proceso debe ser controlado muy cuidadosamente Cualquier defecto o exceso de la solución ácida origina un pH ácido no apto para el desarrollo del bacilo. Para evitar este riesgo se prefiere en las normas actuales aplicar procesos de lavados con un buffer de pH neutro para eliminar la base utilizada para decontaminar.

CONCENTRACIÓN DE LOS BACILOS

El volumen que puede ser inoculado en cada tubo, placa o botella con medio de cultivo es de 0,1 a 0,5 ml. Para concentrar en ese inóculo la mayor parte de BAAR presentes en una muestra es necesario sedimentarlos por centrifugación u otro proceso efectivo e inocuo de precipitación. Cuando la fuerza que se aplica para precipitar es insuficiente se pierden muchos bacilos en el sobrenadante, que es descartado, y por lo tanto disminuye en forma crítica la potencia del cultivo para detectar bacilos escasos.

EXIGENCIAS PARA EL DESARROLLO DEL BACILO IN VITRO

Nutrientes en los medios de cultivo

El bacilo de la tuberculosis puede crecer utilizando glicerol como fuente de carbono, y asparagina e iones de amonio como fuente de nitrógeno y micronutrientes. Metaboliza el glicerol a piruvato. *M. bovis* raramente crece a partir de una muestra clínica en un medio con glicerol porque no puede procesar este compuesto o lo hace con mucha dificultad, prefiere un medio con piru-

vato o glutamato de sodio. Otro componente clave para el desarrollo del bacilo es la albúmina, habitualmente incorporada en los medios de cultivo con el agregado de huevos de gallina o seroalbúmina bovina. Algunos medios sintéticos contienen biotina y catalasa para estimular el desarrollo de bacilos dañados

Es posible distinguir las colonias características de *M. tuberculosis* desarrolladas en un medio sólido a base de huevos coagulados o conteniendo agar. El medio con agar transparente facilita la visualización de colonias pequeñas y puede ser inspeccionado con una lupa o microscopio, lo que adelanta la detección de los cultivos positivos. En cambio, cuando se detecta desarrollo en un medio líquido es necesario verificar mediante una baciloscopia si se trata de BAAR, porque visualmente es muy difícil distinguir el desarrollo del bacilo de la contaminación

El caldo y agar enriquecido favorecen el desarrollo de las micobacterias, particularmente de las ambientales, pero también de la flora contaminante. Cuando se utilizan esto medios para inocular muestras, normalmente se agrega una mezcla con antibióticos inocuos para las micobacterias pero que contribuyen a impedir el desarrollo de la contaminación.

Se ha demostrado que la combinación de distintos medios incrementa la posibilidad de obtener cultivos positivos. Varios factores pueden explicar esto. En primer lugar se ofrecen más nutrientes para que desarrollen algunas cepas del bacilo de la tuberculosis y de otras micobacterias con exigencias particulares. En segundo lugar se amortigua las consecuencias que tiene el trabajar con un único lote de medio que fortuitamente pudo haber resultado con mala calidad. Por último, es más probable que se puedan recuperar aislamientos cuando hay contaminantes que desarrollan en alguno de los medios, generalmente en los más ricos, pero que resultan inhibidos en otro. Cuando sólo es posible utilizar medios a base de huevos, conviene sembrar las muestras en Löwenstein Jensen y Stonebrink u Ogawa simultáneamente. En la medida en que sea posible, es conveniente agregar además algún caldo o medio con agar especialmente para las muestras que contienen bajo número de bacilos, como son la mayoría de las extrapulmonares.

Condiciones y tiempo de incubación

El bacilo de la tuberculosis se ha adaptado a vivir a la temperatura corporal del hombre y en la oscuridad. Se multiplica mejor cerca de los 37 ºC, la velocidad de desarrollo disminuye al alejarse de esa temperatura, muy difícilmente crece por debajo de los 34 ºC y puede morir por encima de los 40 ºC. La luz solar (UV) es perjudicial para su sobrevivencia

Algunas micobacterias ambientales prefieren temperaturas más bajas para desarrollar especialmente las que suelen afectar a la piel y tejidos superficiales

El tiempo en el que detecta un cultivo positivo depende de lo enérgico del método de decontaminación aplicado, del pH al que haya quedado el inóculo luego del tratamiento, de la riqueza del medio de cultivo y de que éste contenga o no algún sensor que evidencie el desarrollo antes de que se haga visible. Pero también depende de las características peculiares de algunas cepas del bacilo, de la cantidad de bacilos que haya en la muestra de la lesión y del tiempo durante el cual se ha administrado tratamiento antituberculoso al paciente. Existen cepas de bacilos y clones multirresistentes que son más fastidiosos para multiplicarse. La mayor parte de las muestras con baciloscopia 3+ evidencian desarrollo dentro de las primeras 3 semanas de incubación en medios a base de huevos, y dentro de los 10 días en medios más ricos. A partir de muestras con muy escasos bacilos, no detectables por baciloscopia, las colonias aparecen tardíamente, aproximadamente hasta 8 semanas después de la siembra en medios a base de huevos y hasta 6 semanas de ser sembradas en agar o caldos enriquecidos.

Tan prolongada incubación a 37 ºC debe ser hecha en tubos, viales o botellas que además de ofrecer bioseguridad, eviten la desecación. A la vez el bacilo es aerobio estricto y por eso debe quedar atrapada una atmósfera de oxigeno dentro del tubo, vial, botella o placa. En gene-

ral es mejor el desarrollo en tubos grandes. Las placas con agar son colocadas dentro de bolsas de polietileno para evitar la desecación pero deben ser permeables al pasaje de aire. Una atmósfera de CO2 al 10% durante la primera semana de incubación favorece el desarrollo de las micobacterias en caldos o medios con agar, aunque no es indispensable.

La agilidad en el procesamiento de las muestras,

el empleo de métodos de decontaminación menos agresivos,

la utilización de una buena centrífuga,

la combinación de medios,

la incubación en una estufa precisa permiten incrementar la confirmación bacteriológica

del diagnóstico de tuberculosis por cultivo.

RIESGO BIOLÓGICO INHERENTE A LOS PROCEDIMIENTOS

La agitación y centrifugación de tubos conteniendo suspensiones con bacilos durante la homogeneización/decontaminación/concentración generan aerosoles infecciosos que incrementan el riesgo biológico en un laboratorio que realiza cultivo, en relación con el que realiza sólo baciloscopia. El riesgo es mayor cuanto mayor es la carga de bacilos que contenga la muestra y cuando mayor la cantidad de muestras conteniendo bacilos procesadas.

CONTAMINACIÓN CRUZADA

Es la transferencia accidental de microorganismos, en este caso del bacilo de la tuberculosis, de una muestra a otra al ser procesadas en serie en el laboratorio. Las fuentes de este tipo de contaminación son generalmente muestras que contienen abundantes bacilos Este error que puede originar falsos resultados positivos del cultivo, ha sido detectado con mayor frecuencia que la esperada, y se encuentra prácticamente en todos los laboratorios que lo investigan. La sobrecarga de trabajo, la alta frecuencia de muestras con baciloscopia positiva en la rutina, el desorden, los procedimientos poco rigurosos, la utilización de reactivos no alicuotados, son condiciones propicias para este tipo de contaminación de laboratorio. Se puede transferir material por salpicaduras, con las manos o la ropa, mediante soluciones, pipetas o dispensadores contaminados.

CUANTIFICACIÓN DEL DESARROLLO DE *M. tuberculosis*

El desarrollo en medios sólidos es cuantificado utilizando una escala semicuantitativa que es reproducible, expresa la cantidad de bacilos detectados y permite evidenciar variaciones significativas de esa cantidad. Por lo tanto es indicativa del grado de avance y evolución de la enfermedad. En el caso de los medios líquidos, el tiempo que demanda la detección del resultado positivo es, generalmente, indicativo del número de bacilos presentes en la muestra

ELECCIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO SEGÚN LOS RECURSOS DISPONIBLES

La selección del método a emplear entre los incluidos en las normas debe resultar de un análisis riguroso y realista de

- el presupuesto regular y continuo que está asegurado para cubrir todas las prioridades para las que debe aplicar el cultivo
- la eficiencia con la que se comercializan y compran los insumos necesarios
- el entrenamiento del personal y equipamiento del laboratorio
- la celeridad con la que se procesan las muestras luego de recolectadas
- la asistencia técnica que tienen los equipos necesarios en el lugar donde se aplica el método

El siguiente cuadro muestra los métodos más utilizados internacionalmente, particularmente en Latinoamérica, para el cultivo del bacilo de la tuberculosis y que han demostrado ser útiles para el manejo clínico y epidemiológico de la tuberculosis. Se presentan en orden creciente de

- costo
- complejidad
- riesgo biológico
- sensibilidad
- (probabilidad de obtener cultivos positivos a partir de muestras conteniendo bacilos)
- rapidez para detectar un cultivo positivo

MÉTODO DE KUDOH OGAWA

Se han desarrollado y evaluado varias modificaciones del Metodo de Petroff que, aunque puedan resultar menos eficientes en laboratorios muy bien equipados y con alto presupuesto, son muy útiles para situaciones en las que es necesario establecer el cultivo en laboratorios con estufa de incubación pero sin centrífuga adecuada, muchas veces sin área de contención de las actividades de mayor riesgo, y con difícil acceso a un laboratorio de referencia. La variante más utilizada en Latinoamérica es una modificación de la técnica de Ogawa Kudoh, económica, muy sencilla y suficientemente sensible como para asegurar que el cultivo contribuya a confirmar el diagnóstico de tuberculosis pulmonar, en casos con baciloscopia negativa. Utiliza hisopos para tomar y procesar la muestra a sembrar, y medios a base de huevo con pH acido. Es útil para recuperar los bacilos de esputos de pacientes bacilíferos que requieren prueba de sensibilidad. Genera riesgo biológico similar al de la baciloscopia pues no requiere centrifugación de suspensiones con bacilos.

Método de decontaminación	**Medio(s) de cultivo necesarios**		**Requerimientos**	
			Equipamiento centrifuga y cabina de seguridad biológica	**Presupuesto**
Kudoh Ogawa	A base de huevos, acidificados (Ogawa)	Pueden ser preparados en el laboratorio a partir de una fórmula simple No dependientes de insumos o equipos de una marca determinada	----------	Bajo
Petroff modificado NALC- NaOH	A base de huevos, neutros (Löwenstein-Jensen, Stonebrink, Ogawa)		Adecuado y con buen funcionamiento verificado	Bajo-intermedio
	A base de huevos, y agar o caldos enriquecidos Middlebrook $7H_{11}$,$7H_9$)*	Los medios de Middlebrook pueden ser preparados en el laboratorio partiendo de su fórmula compleja, o con bases deshidratadas, y enriquecimientos y mezclas de antibióticos listos para agregar	Adecuado y con buen funcionamiento verificado	Intermedio Los enriquecimientos de los medios y el NALC son los insumos de mayor costo
	Caldos con sensores del desarrollo bacteriano (MGIT, MB/BacT).	Pueden ser leídos visualmente o con equipos automatizados Producidos por la industria Los equipos generan dependencia de insumos de una marca determinada	Adecuado y con buen funcionamiento verificado	Alto

** El medio de Kirchner es un caldo con fórmula mas simple y económica pero es enriquecido con suero bovino estéril que, en general, no está fácilmente disponible.*

MÉTODO DE PETROFF

El el método más difundido en el mundo entero, y en especial en países en desarrollo donde la tuberculosis es prevalente, es el de homogenización/ decontaminación con la técnica de Petroff modificada, y la inoculación en medios a bases de huevos con pH cercano al neutro. Es el más conveniente teniendo en cuenta la situación de la mayor parte de los laboratorios que realizan cultivo. Los medios a base de huevos son los más económicos y siempre es beneficioso utilizarlos, aun cuando sea posible agregar otros medios para cultivar las muestras.

MÉTODOS MÁS COSTOSOS

Ciertas variaciones del método de Petroff permiten recuperar más bacilos y acelerar los resultados con un incremento de costos. Al considerar el estas alternativas es necesario analizar si se tienen asegurados:

- el procesamiento diario de las muestras a las pocas horas de recolectadas
- la revisión, al menos semanal, de los cultivos en medios sólidos, y con mayor frecuencia de los caldos y medios con agar en incubación
- el informe inmediato de resultados de cultivos positivos
- la transmisión inmediata de los resultados al centro de salud/médico que atiende el paciente
- la utilización oportuna del resultado del cultivo por parte del médico

No es razonable encarecer los servicios de laboratorio

si antes no están aseguradas las condiciones para que el mayor costo

resulte en una optimización del manejo de los casos de tuberculosis

Aseguradas estas condiciones, conviene priorizar la introducción de técnicas más caras en laboratorios con demostrada calidad en el cultivo convencional y que concentren el diagnóstico de casos críticos de tuberculosis (infantil, extrapulmonar, asociada a infección por HIV, multirresistente). En estos laboratorios, a la vez, es posible seleccionar para procesar por las técnicas más costosas sólo las muestras de pacientes que requieren prioritariamente rapidez en la obtención del resultado del cultivo, y mantener los procedimientos convencionales para el resto de las muestras

Empleo de medios sintéticos

Cuando es posible contar con recursos adicionales a los necesarios para la implementación de la técnica de Petroff, pero aún son insuficientes para mantener en funcionamiento algún equipo de lectura automatizada de cultivos, se puede considerar la posibilidad de adoptar el procedimiento de homogenización/decontaminación de las muestras con NALC-NAOH y el agregado de medios semisintéticos enriquecidos, además de los medios a base de huevos, para sembrar las muestras. Estos medios favorecen el desarrollo de contaminantes, por lo tanto no son recomendables si no se procesan las muestras sin demoras después de recolectadas. Los medios líquidos son beneficiosos para el desarrollo del bacilos pero es necesario tener en cuenta que, si son utilizados, será necesario controlar mediante examen microscópico todo tubo o botella donde se detecte desarrollo, y eventualmente subcultivarlos para obtener aislamientos puros. Esto implica mayor carga de trabajo y, por ende, necesidad de recursos humanos adicionales. Por otra parte, la manipulación de cultivos positivos obtenidos en caldos incrementa el riesgo de generar aerosoles infecciosos en el laboratorio y de transferir bacilos de un cultivo a otro, generando falso resultados positivos, de manera que deben ser utilizados por personal muy entrenado.

Para reducir el costo de cultivo utilizando medios sintéticos es posible utilizar medio Middlebrook $7H_{11}$ en una capa delgada, dentro de placas de Petri pequeñas. Estas placas pueden ser examinadas dos veces por semana con aumento de 100x o 400x bajo la lente de un microscopio. Así es posible reducir al menos a la mitad el tiempo para identificar un cultivo positivo, con relación a lo que se demora con medios a base de huevos Se alcanza entonces la celeridad de la lectura automatizada de cultivos. Pero el examen de placas demanda mucho tiempo, sobre todo si se aplica para investigar un alto número de muestras. Es una alternativa que merece ser considerada para investigar en forma selectiva ciertas muestras, en especial extrapulmonares, y de pacientes críticos

Sistemas para la lectura automatizada de cultivos

Permiten cuantificar la disminución de O_2 o el aumento de CO_2 que ocurre en una botella o tubo con medio liquido cuando se está reproduciendo una bacteria. Son estufas de cultivo con sensores (colorimétricos, fluoro-

métricos, o barométricos) capaces de detectar y evidenciar cambios de presión de estos gases, conectados a una computadora para identificar la señal del cultivo positivo y el registro y análisis de los resultados. Los de uso más difundido en Latinoamérica son el BACTEC y el MB Bact. El equipo BACTEC 460 que utiliza medios de cultivo con una fuente de carbono marcada radiactivamente ha sido de mucha utilidad pero, por los inconvenientes que origina el empleo de material radioactivo, la industria lo ha reemplazado por el BACTEC MGIT 960. Este último utiliza el medio de cultivo MGIT (*Mycobacterial Growth Indicador tube*) que también puede ser inspeccionado sin equipos, utilizando una lámpara UV para ver la fluorescencia que indica el desarrollo de un germen.

Estos sistemas aplican un método de procesamiento y siembra de muestras muy similar al convencional, de manera que no disminuyen el trabajo previo a la siembra. Pero sí simplifican el control de los cultivos en incubación y acelerar la detección de los cultivos positivos. Son especialmente recomendables cuando se procesa un alto número de muestras.

En el momento de seleccionar un equipo es importante conocer cuáles han sido aceptados por las normas de OMS para evaluar la resistencia a drogas antituberculosas para que, además, puedan ser utilizados para acelerar significativamente las pruebas de sensibilidad.

El incremento de costo por muestra analizada que originan estos sistemas, en relación con el de los métodos convencionales, es variable pero siempre significativo. Es mayor para los laboratorios habituados a preparar sus propios medios de cultivo a base de huevos, los que procesan un bajo número de muestras y que por lo tanto deben comprar pocas botellas o tubos con medio, los que están alejados de las capitales de los países y los que están en países con altos aranceles de importación. Las empresas que proveen los equipos de lectura automatizada normalmente los ofrecen sin que sea necesario adquirirlos, si el laboratorio se obliga a comprar una cantidad de botellas o tubos. Esta opción es poco viable en laboratorios con bajo número de muestras para procesar. Se han registrado problemas de comercialización de los viales con medio de cultivo y en la asistencia técnica de los equipos en plazas que no son atractivas porque sólo tienen uno o unos pocos equipos funcionando.

La decisión de incorporar estos sistemas automatizados de lectura de cultivos debe ser tomada en el contexto de un plan de refuerzo de la capacidad de los laboratorios de la red, en especial para mejorar el manejo de casos de tuberculosis entre pacientes infectados por HiV y de tuberculosis multirresistente. Para que el esfuerzo y gasto inicial que implica la incorporación de estos equipos no sea infructuosa, debe mediar el compromiso de las autoridades del Ministerio de Salud de asegurar el presupuesto necesario en forma sostenida y regular. Debería además mediar un compromiso firmado por el proveedor para

- mantener el precio de reactivos y medios a un nivel aceptable para el país
- garantizar adecuadas condiciones de transporte de los reactivos y medios de cultivo y la entrega de estos insumos con vencimiento posterior a los 6 meses
- proveer manuales detallados en castellano, entrenamiento inicial y soporte técnico permanente para la operación del sistema
- garantizar servicio técnico y repuestos inmediatos cuando sean necesarias las reparaciones
- asegurar asistencia comercial ágil e ininterrumpida

Los equipos deben ser incorporados preferentemente en laboratorios que concentren el diagnostico de casos complicados, que tengan calidad y bioseguridad garantizadas, personal suficiente y muy entrenado, fuente de electricidad ininterrumpida, temperatura ambiental controlada no superior a los 28 °C, espacio suficiente para albergar los equipos, y agilidad en los mecanismos de compras.

UBICACIÓN DE LAS TAREAS Y DE LOS EQUIPOS. FLUJO DEL MATERIAL

Como fue explicado en la primera parte de este Manual, la exposición a las pequeñas gotas emitidas con la tos de los pacientes bacilíferos es lo primero que se debe evitar. Los pacientes deben ser atendidos, en forma ágil y rápida, fuera del laboratorio, en un área o local particularmente dedicado a esta tarea, con renovación permanente del aire. Si los sistemas de renovación del aire que se instalen en el laboratorio toman aire de la sala de espera, se estará incrementando el riesgo del personal del laboratorio en vez de disminuirlo

En lo que se refiere a las tareas internas del laboratorio, por sobre todas las cosas es necesario

- **agrupar tareas según el nivel de riesgo**
- **encontrar la mejor ubicación posible para cada categoría de tareas en el espacio disponible**
- **establecer una organización que asegure una ruta lógica, sin obstrucciones y segura del material más peligroso**

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

Las tareas con distinto nivel de riesgo deben ser ubicadas convenientemente para que se direccione el material (potencialmente) infeccioso desde un área de riesgo mediano a otra de mayor riesgo. Esta última área debe estar muy bien separada, y allí se intensificará la extracción de aire, los cuidados en el trabajo cotidiano, las medidas de contención del riesgo y de contingencia para accidentes.

TAREAS DE MUY BAJO RIESGO

- **administración** del laboratorio,
- **preparación y almacenamiento** de materiales, reactivos, medios de cultivo
- **lavado y reciclado de material de vidrio previamente autoclavado**

Pueden ser situadas y organizadas con flexibilidad, según sea más conveniente en el espacio que se disponga. Deben ser ubicadas en áreas ¨limpias¨ donde no ingresan pacientes, ni muestras, ni cultivos positivos, ni elementos utilizados en el área de procesamiento de muestras sin que antes hayan sido esterilizados. Pueden estar centralizadas por unidades que asistan no sólo al diagnóstico de tuberculosis sino a varios servicios del laboratorio

En el área de lavado y reciclado de material de vidrio se requiere una pileta/lavabo amplio, una mesada también amplia, un autoclave y una estufa (preferentemente de esterilización)

En el área de preparación de medios de cultivo y reactivos se requiere una mesada, una balanza, un pHmetro, una estufa o coagulador y un refrigerador con capacidad suficiente para almacenar los medios y reactivos que necesitan ser mantenidos a temperatura cercana a los 4° C

El lavado y reciclado de material y la preparación de medios y reactivos pueden ser ubicados en un mismo laboratorio si es necesario y el espacio es suficiente para albergar ambas actividades

TAREAS DE RIESGO MEDIANO

- **ingreso de muestras**
- **examen microscópico de los extendidos**

Se debe seleccionar para estas áreas mesas, sillas, armarios, estantes y mobiliario que puedan ser descontaminados con solución de hipoclorito de sodio. Si solo se dispone de mobiliario de madera, es necesario pintarlo con pintura impermeable que resista la acción de descontaminantes. Para permitir la limpieza y desinfección, se debe dejar espacio alrededor de muebles y equipos y no se debe almacenar material directamente sobre el piso

Es necesaria una mesa para recibir las muestras y un armario con buena capacidad para guardar libros y carpetas. En este cuarto se controlan los envases, se verifica la consistencia de la identificación de los envases con la de las solicitudes, se ingresa la información en el registro del laboratorio y se archivan solicitudes y formularios recibidos con las muestras

En otra mesa pueden ser ubicados el/los microscopio/s para que el personal no esté expuesto en el área de mayor riesgo mientras lee los frotis.

Por este sector también ingresa el material de vidrio reciclado, medios de cultivo y reactivos necesarios para el procesamiento de muestras.

A la vez, esta área puede funcionar como antecámara del laboratorio de procesamiento de muestras y aislamientos, si no es posible contar con un pequeño cuarto con doble puerta, ubicado antes del laboratorio de mayor riesgo. La antecámara contribuye a mantener la presión negativa dentro del laboratorio de procesamiento de muestras y aislamientos, y modera los movimientos de aire en el momento de ingreso/egreso del personal

TAREAS DE MAYOR RIESGO

- **procesamiento de muestras y de aislamientos de *M. tuberculosis***
- **esterilización del material (potencialmente) infeccioso**

Para las áreas dedicadas a estas tareas también se requiere mobiliario e instalaciones que puedan ser descontaminados con solución de hipoclorito de sodio.

EL LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y AISLAMIENTOS

Contiguo al área de ingreso de material, y preferentemente antecedido por una antecámara, debe estar el laboratorio donde serán procesadas las muestras. Es un laboratorio de acceso restringido al personal técnico y profesional del laboratorio. Los requerimientos mínimos son:

- muros íntegros desde el piso hasta el techo, de manera que el aire no salga de este laboratorio cuando su puerta esté cerrada.
- puerta (s) y ventanas con cierre hermético para evitar filtraciones de aire y brindar seguridad contra actos de vandalismo.
- es conveniente un panel de vidrio en puerta que permita visión desde afuera del laboratorio.
- superficies de pisos, paredes, techo y mesadas de material no poroso, lisas y selladas, cubiertos con materiales y pinturas que resistan el tratamiento con solución de hipoclorito de sodio y eventualmente con fenol al 5%.
- fácil acceso al área de decontaminación de materiales.
- muy buena iluminación.

- agua corriente, gas y electricidad
- una pileta/lavabo para hacer coloraciones y otra para el lavado de manos (preferentemente ubicada cerca de la salida del laboratorio).
- dos mesas/ mesadas (una para la preparación de frotis y otra para la lectura de cultivos).
- espacio suficiente para ubicar una centrifuga, una estufa de incubación un refrigerador amplio (preferentemente dos, uno para material limpio y otro para muestras y aislamientos) y una cabina de seguridad biológica.
- un sistema de extracción de aire
- acondicionador de la temperatura si el clima es muy calido o muy frío y genera incomodidad en el personal, que no genere movimiento de aire

Se debe impedir que funcionen en este laboratorio sistemas de recirculación/calefacción/refrigeración de aire que intercambien aire entre distintas áreas de la unidad de salud, y que generen movimientos de aire sobre la mesa de trabajo. Si existen bocas de estos sistemas dentro del laboratorio, deben ser anuladas y selladas. Tampoco los extractores deben generar movimientos de aire directamente sobre la mesada de trabajo. Al elegir el sistema de extracción de aire se debe considerar que debe renovar el aire al menos 6 veces por hora. Cada extractor debe ser ubicado lo más alto posible, en la pared opuesta a la puerta de ingreso, y deben expulsar el aire hacia un área abierta, no transitada, lejos de edificios ocupados y tomas de aire. De esta manera se logra barrer el aire, desde las áreas de menor riesgo hacia las de mayor riesgo, para luego expulsarlo hacia el exterior donde los aerosoles quedan diluidos en el espacio abierto y sometidos a la actividad esterilizante de los rayos solares. Las cuidadosas prácticas de trabajo que deben ser implementadas en esta área minimizan la posibilidad de crear aerosoles y expulsar bacilos con el aire del laboratorio. En consecuencia, el aire no queda estancado dentro del laboratorio, no se acumulan aerosoles en varios días de trabajo y, no regresa el aire del laboratorio a áreas de la unidad de salud donde circula el resto del personal. Se crea presión negativa dentro del laboratorio. Existen sistemas para verificar visualmente la presión negativa. Un método muy simple consiste en suspender en la puerta de ingreso un pañuelo de papel, pequeño y muy liviano, y verificar que mueva hacia el interior del laboratorio impulsado por el movimiento del aire.

La cabina de seguridad biológica filtra y retiene a los bacilos que pueden quedar suspendidos en las operaciones de mayor riesgo. Es necesario impulsar un proceso para que los laboratorios de la red que hacen cultivo estén equipados con este tipo de cabinas durante el cual, lógicamente, se debe priorizar a los laboratorios con mayor nivel de riesgo que son los que tienen alguna de las siguientes tres características:

- procesan con frecuencia muestras con baciloscopia positiva utilizando centrifugación
- obtienen en promedio más de 5 cultivos positivos por mes
- abren cultivos positivos para su identificación o prueba de sensibilidad

La integridad del flujo de aire en la cabina de bioseguridad puede ser perturbada por cualquier corriente de aire que generen los movimientos de personas, ventanas abiertas, apertura y cierre de puertas. Por esta razón debe estar ubicada en un lugar donde la circulación de personal sea la indispensable y lejos de puertas y ventanas que se abran. Conviene dejar un espacio de unos 30 cm libres alrededor del equipo para poder acceder durante las tareas de control y mantenimiento.

Cuando se utilizan cabinas de seguridad biológica, no es indispensable tener un sistema de extracción de aire, aunque lógicamente es conveniente. La extracción puede ser realizada por la misma cabina mientras está en funcionamiento, expulsando el aire a través del ducto hacia el exterior. El técnico que la instale debe asegurar que no haya recirculación de aire hacia el interior del laboratorio por este ducto. La presión negativa se interrumpe al apagar la cabina, por lo que es necesario dejarla en funcionamiento durante todas las horas de trabajo si es el único sistema de extracción de aire.

Las centrífugas de mesa deben ser estar a una altura cómoda para que pueda verse el rotor y para operar sin dificultad.

Si hay espacio suficiente y es posible contar con laboratorios separados o compartimentos creados con divisiones que no permitan la circulación de aire entre distintas zonas de trabajo, es conveniente ubicar la coloración de frotis en uno, la cabina de seguridad biológica dentro de otro compartimiento, y la centrifuga en un tercero. De esta forma, si se produce algún accidente en la cabina o en la centrifuga, es posible cerrar el laboratorio o compartimiento y contener allí el riesgo hasta solucionar el problema. El aislamiento de la cabina de seguridad biológica también es conveniente cuando es necesario decontaminarla con vapores tóxicos, por ejemplo previo a un cambio de filtros

Los tubos con luz ultravioleta son económicos y útiles para completar la desinfección de superficies cercanas. Las cabinas de seguridad biológica tienen un tubo de UV. También pueden ser colocados sobre otras mesadas de trabajo, sobre el área donde se deja la ropa de trabajo, sobre la centrifuga.

El personal debe protegerse con batas de uso exclusivo para esta área, que se pondrá al ingresar y deberá sacarse al terminar sus tareas y salir. Es necesario entonces organizar un área con percheros y estantes para ordenar la ropa de trabajo en la antecámara, separando la ropa limpia de la utilizada.

ÁREA DE ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL CONTAMINADO

Aquí se ubican el/los autoclaves utilizados para decontaminar muestras y, sobrenadantes que deben ser desechados, y el material de vidrio utilizado con material (potencialmente) infeccioso que debe ser reciclado (tubos, pipetas).

Debe ser fácilmente accesible desde el laboratorio de procesamiento de muestras, de manera que no sea necesario transportar el material contaminado grandes distancias o a través de escaleras/ascensores Lo ideal es que esté en un cuarto contiguo al laboratorio de procesamiento de muestras, comunicado por una puerta distinta a la de ingreso de muestras y material. Así las muestras y el material que debe ser reciclado siguen el siguiente recorrido en una única dirección: área de ingreso, área de procesamiento, área de decontaminación.

Luego de esterilizado, se procede al descarte del material desechable, siguiendo las normas operativas del servicio de salud. Como el material fue autoclavado ya no genera riesgo biológico

El material de vidrio reciclable puede ser trasladado, luego de esterilizado y ya sin riesgo, al área de lavado- preparación- esterilización la que, idealmente, estará ubicada en forma contigua a la de decontaminación de material

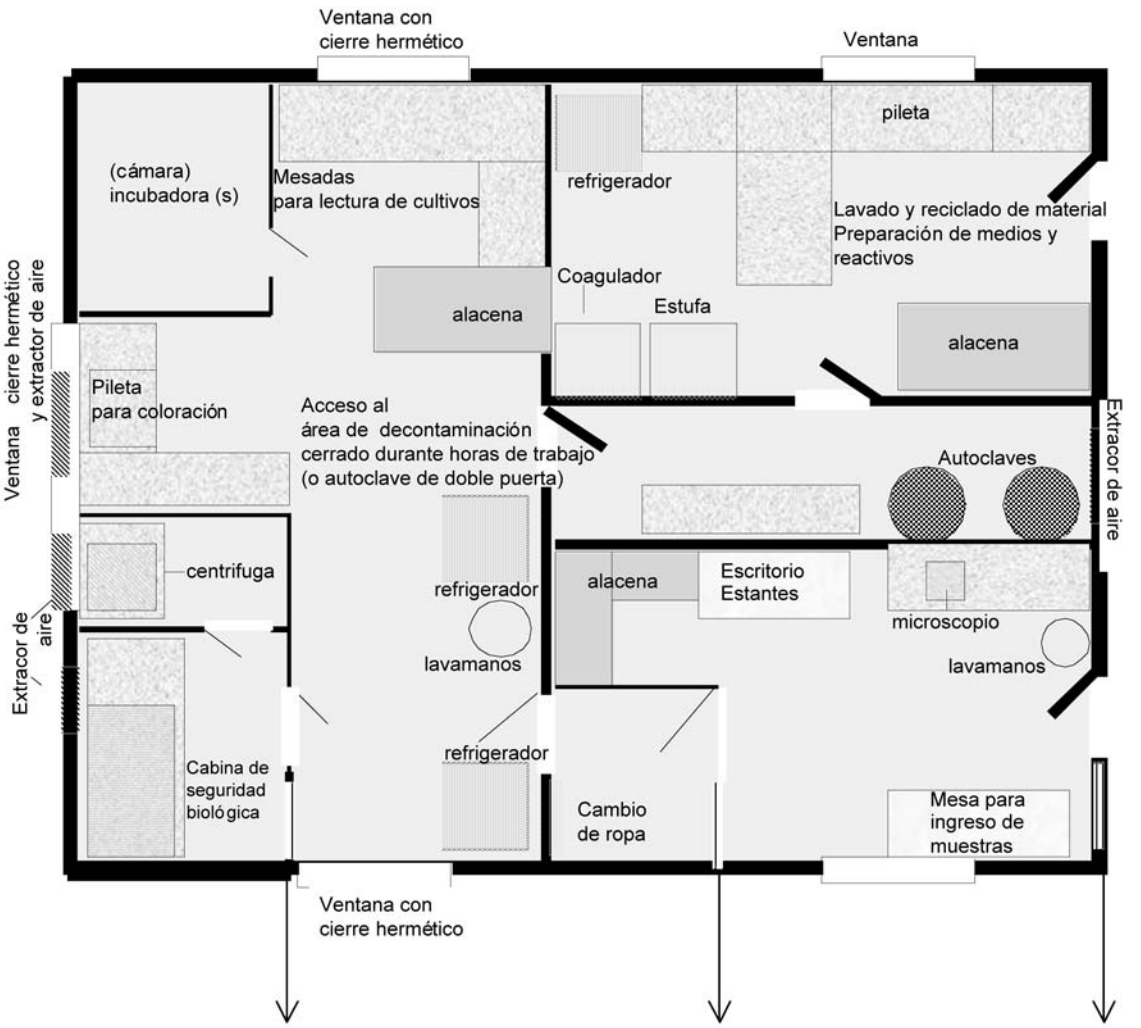
En el Anexo II se presenta el equipamiento y material mínimo necesario en un laboratorio que realiza cultivo para tuberculosis

ESCALAMIENTO DE LA BIOSEGURIDAD EN LAS INSTALACIONES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA CON ALTO RIESGO BIOLÓGICO

Para laboratorios de referencia que concentran la identificación y pruebas de sensibilidad para toda la red, que investigan un alto número de aislamientos de *M. tuberculosis,* en particular los que son resistentes a las drogas antituberculosas, es pertinente considerar mayores medidas de bioseguridad, ciertamente más costosas y dependientes de un servicio de mantenimiento especializado.

Una medida de protección mayor del medio ambiente y de las personas ajenas al servicio consiste en que el aire sea esterilizado antes de ser expulsado hacia el exterior. Se logra mediante la instalación de filtros de partículas de gran eficiencia HEPA (del ingles *High efficiency particulate air*) en la abertura por donde sale el aire. Estos filtros deben ser periódicamente controlados y reemplazados. Esta medida es recomendable, aun con un nivel de riesgo mediano, cuando no es posible expulsar el aire del laboratorio a un espacio abierto. De esta forma el aire será doblemente filtrado, primero por la cabina de seguridad biológica y segundo por el filtro de salida al exterior.

Ejemplo de organización de áreas de trabajo e instalaciones del laboratorio para el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*



Cerramientos que pueden, eventualmente, ser desmontados para el ingreso de equipos de gran tamaño

El acceso a la antecámara y luego al laboratorio de mayor riesgo mediante puertas que cierran solas y herméticamente facilita la contención del riesgo cuando circula el personal

Otra medida para extremar la contención del riesgo exclusivamente en el laboratorio de procesamiento de los aislamientos, consiste en la instalación de un autoclave en el mismo laboratorio, de doble puerta, en posición horizontal atravesando un muro del laboratorio. Una puerta de esta autoclave se abre desde el laboratorio donde se procesan muestras y por allí se introduce el material contaminado. Una vez esterilizado, el material es extraído abriendo la segunda puerta en el otro extremo de la autoclave, por fuera del laboratorio, idealmente en el área de lavado y reciclado de material de vidrio. Si no es posible, puede estar en un pasillo exterior al laboratorio desde donde se trasladará el material al área de lavado y reciclado. Así es posible asegurar que no salga ningún material del área de mayor riesgo sin previa esterilización.

Es recomendable considerar estas posibilidades cada vez que se piense en las instalaciones de un laboratorio nuevo o en mejorar las instalaciones de un laboratorio existente.

Algunos laboratorios de Latinoamérica con muy alto riesgo biológico han encarado la instalación de laboratorios y practicas del nivel BL2+ o BSL3 que no son consideradas en especial en este Manual.

TOMA, RECEPCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Las normas concernientes a bioseguridad, envases, momento y forma de recolección y número de muestras a recolectar según la localización de la lesión, han sido descritas en la primera parte de este Manual dedicado a la baciloscopia.

Son válidas todas las recomendaciones allí detalladas para facilitar y agilizar la recepción de muestras, para preservarlas, asegurar su correcta identificación, registro en el libro del laboratorio y la bioseguridad durante su manipulación y transporte.

En particular, es preciso tener presente que para el cultivo es fundamental observar las siguientes recomendaciones

- **Procesar las muestras con la menor demora posible.** Lo ideal es procesar las muestras de contenido gástrico y las extrapulmonares dentro de las cuatro horas siguientes a la recolección. Para lograrlo es necesario establecer una organización conjunta entre el personal del laboratorio y el equipo médico que toma las muestras.
- **Preservar las muestras de la luz solar, desecación y el calor.** Mantenerlas refrigeradas a 4° C hasta el momento de su procesamiento si inevitablemente debe transcurrir más de 24 horas desde la recolección hasta la siembra.
- Cuando la muestra de esputo debe ser transportada y queda inevitablemente **expuesta a temperatura ambiente durante más de 48 horas** después de recolectada, **agregar igual volumen de cloruro o bromuro de cetilpiridinio 1% disuelto en una solución de cloruro de sodio al 2%.** Estos reactivos homogeneizan el mucus y restos orgánicos y decontaminan la muestra durante el transporte. En este caso, la muestra no debe ser refrigerada porque estos decontaminantes cristalizan a baja temperatura y, una vez cristalizados, no protegen e inhiben el desarrollo del bacilo de la tuberculosis. Se ha descrito que estas soluciones pueden inhibir el desarrollo del bacilo en medios líquidos y por eso se ha recomendado no utilizarlos cuando se emplean estos caldos.
- Nunca agregar a las muestras **fenol, formol o solución de formaldehido.** Algunos anestésicos tienen actividad antimicrobiana y por lo tanto también deben ser evitados. Esto puede ser desconocido por el equipo médico que toma biopsias y sigue procedimientos indicados para estudios histopatológicos, inadecuados para el cultivo de micobacterias y también de otros microorganismos.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL

El personal que procese muestras debe estar entrenado en

- riesgos, forma de transmisión de la tuberculosis
- higiene
- uso de ropa de protección
- manejo de material (potencialmente) infeccioso
- operaciones para evitar la formación de aerosoles
- organización del laboratorio, flujo de material y del aire
- operaciones a realizar en el caso de accidentes
- operación y mantenimiento de los equipos de laboratorio
- buenas practicas de laboratorio
- operaciones en esterilidad
- importancia de los resultados para el manejo de casos
- importancia de los resultados para el Programa de Control de Tuberculosis

ORGANIZACIÓN DEL MATERIAL

Es necesario sistematizar el trabajo para

- minimizar el riesgo biológico y de transferencia de bacilos entre distintos materiales
- evitar confusiones
- poder rastrear los procedimientos en el caso en que se presente dudas sobre los resultados

- Repetir los procedimientos siempre el mismo orden en cada día de trabajo. Ordenar los envases de las muestras, tubos y portaobjetos según su numeración. Mantener todo el material ordenado durante todo el proceso.
- Separar las muestras de los pacientes que se conoce tienen baciloscopia positiva
  Los laboratorios que no tienen cabina de seguridad biológica no deben procesar con centrifugación muestras con baciloscopia positiva, para minimizar el riesgo biológico. Estas muestras son generalmente investigadas para identificar el bacilo observado en el examen microscópico y/o conocer su sensibilidad a drogas antituberculosas. En

tal caso es conveniente **derivar directamente la muestra al laboratorio de referencia** para que allí se realicen estos estudios. Esto posibilita, a la vez, que la muestra sea sembrada directamente en medios con antibióticos para acelerar la prueba de sensibilidad. Si no es posible realizar esta derivación, cuando se recibe la muestra se puede optar por procesarla por un método que no utilice centrifugación como el de Ogawa Kudoh, y derivar el tubo de medio de cultivo inoculado tan pronto como sea posible al laboratorio de referencia.

Los laboratorios con cabina de seguridad también deben separar y procesar al final las muestras de los pacientes que se conocen son bacilíferos para disminuir el riesgo de contaminación cruzada.

La siguiente es una guía para ordenar las muestras y el material a utilizar

a) Ordenar todas las muestras que serán cultivadas según su número.
b) Identificar y separar para derivar o para procesar al final las muestras de pacientes bacilíferos.
c) Numerar para cada muestra un tubo de centrífuga de 15ml, de plástico, graduado, con fondo cónico, preferentemente estéril. Puede ser necesario más de un tubo en el caso de orinas y contenidos gástricos. Si la centrífuga lo permite, es conveniente centrifugar las muestras de mucho volumen en tubos de 50 ml, también plásticos, graduados, con fondo cónico. No es necesario un tubo de centrífuga para muestras de tejido normalmente estériles y tomadas con asepsia.
d) Por cada muestra, numerar un tubo con cada medio de cultivo a utilizar. Incluir al menos dos tubos con medios a base de huevo, preferentemente uno con medio Löwenstein Jensen y otro con Stonebrink u Ogawa. A estos medios básicos pueden agregarse medios con agar y caldos, especialmente para muestras extrapulmonares y de niños, si los recursos disponibles lo permiten. En el caso de utilizar el método de Ogawa, preparar dos tubos con el medio acidificado por cada muestra
e) Organizar una gradilla con los tubos de cada serie de muestras que pueda ser procesada de una vez, considerando la capacidad de la centrífuga, y otra con las muestras de pacientes bacilíferos, si es que van a ser procesadas en el laboratorio.
f) Ubicar en cada columna de la gradilla el material correspondiente a una muestra, delante el tubos de centrifuga y detrás los tubos con medio de cultivo. Ordenar el material correspondiente a cada muestra, de izquierda a derecha, según la numeración
g) Preparar y numerar un portaobjetos para cada muestra según fuera detallado en la primera parte de este Manual. Ordenar los portaobjetos en una bandeja según su numeración. Mantener los portaobjetos separados uno del otro al menos por 1 cm. de distancia durante todo el proceso, incluso durante la tinción
h) Lavarse las manos. Colocarse guantes desechables
i) Ubicar dentro de la cabina de seguridad todo el material necesario. Conviene tener una lista escrita de este material para no olvidar ningún elemento
   - los envases con las muestras ordenados según su numeración
   - la(s) gradilla(s) conteniendo los tubos de centrífuga y los medios de cultivo ordenados
   - la bandeja conteniendo los portaobjetos ordenados
   - una gradilla vacía para trasladar los tubos hasta la centrífuga
   - algunos tubos de centrifuga adicionales para eventualidades
   - un mortero estéril, un tubo con tapa a rosca conteniendo arena estéril por cada muestra de tejido recibida
   - una pinza estéril por cada muestra de tejido e hisopado recibido
   - un agitador tipo *vortex*
   - un frasco o tubo conteniendo 50 ml de solución decontaminante (NaOH 4%) por cada serie de muestras a procesar, y uno adicional por si fueran insuficientes
   - una botella conteniendo 200 ml de buffer fosfato pH 6,8 estéril por cada serie de muestras a procesar, y uno adicional para necesidades eventuales

- una propipeta o pipetas desechables con bulbo
- pipetas estériles (una de 1 ó 2 ml, una de 5 ml y una de 10 ml por cada muestra recibida) En el caso de utilizar frascos dispensadores para distribuir la solución decontaminante y buffer las pipetas de 10 ml no son necesarias
- uno o dos recipientes de polipropileno, vidrio o acero inoxidable, autoclavables, conteniendo hipoclorito 1%, con capacidad suficiente para contener los sobrenadantes que se descartan en un día de trabajo. Elegir recipientes que minimicen el riesgo de salpicaduras, que puedan ser tapados cada vez que sean utilizados, y cerrados herméticamente para ser trasladados al autoclave al finalizar el día de trabajo
- un recipiente de polipropileno o acero inoxidable con capacidad adecuada para contener las pipetas que se utilizan, conteniendo hipoclorito de sodio 1%. El recipiente debe poder ser cerrado herméticamente para ser trasladado al autoclave
- algodón o pañuelos de papel, un frasco cerrado con hipoclorito 1% para limpiar bocas o paredes de los tubos en caso necesario y otro frasco cerrado con fenol 5% para limpiar eventuales derrames o salpicaduras de mayor magnitud
- una bolsa desechable y autoclavable, con capacidad suficiente para descartar los tubos de centrífuga de plástico que se utilizan en un día de trabajo

j) Ubicar cerca de la cabina un recipiente de polipropileno o acero inoxidable con tapa, para el autoclavado del material que será desechado. Debe tener capacidad suficiente para contener los tubos de centrifuga que se descarten dentro de la bolsa, los papeles y algodón que eventualmente fueran utilizados

k) Ubicar cerca de la cabina o de la mesada de trabajo un segundo recipiente de polipropileno o acero inoxidable con tapa, para el autoclavado del material que será reciclado. Debe tener capacidad suficiente para contener el recipiente con sobrenadantes herméticamente cerrado, pinzas, morteros, y elementos accidentalmente salpicados con material potencialmente patógeno (algún tubo de ensayo de vidrio, recipientes con decontaminante o buffer).

l) Mantener al lado de la centrifuga tubos de centrifuga del mismo tipo de los utilizados para procesar las muestras, en un numero igual a la mitad de los portatubos que tiene el rotor en uso, y un frasco dispensador con agua destilada o etanol 70° para equilibrar los tubos impares

m) Ubicar en la mesada de trabajo la(s) bandeja(s), de acero inoxidable o de otro material que pueda ser desinfectado con hipoclorito de sodio y, eventualmente autoclavado, con una varilla de vidrio u otro elemento similar que permita inclinar los tubos sembrados, elevándolos unos 15 ° en su parte superior.

n) Ubicar cerca del mechero y de la pileta dedicada a la coloración todos los elementos necesarios para la fijación y tinción de los frotis, según lo detallado en la primera parte de este Manual dedicado a la baciloscopia.

Todos los procedimientos que siguen, hasta finalizar la siembra de las muestras, deben ser realizados dentro de la cabina de seguridad biológica con las siguientes precauciones

- Observar todas las normas detalladas en los Anexos I sobre bioseguridad de la primera parte de este Manual dedicada a la baciloscopia y en esta parte dedicada al cultivo.
- Encender la cabina de seguridad biológica, permitir que se establezca el flujo laminar de aire y evitar alterarlo.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se recomienda procesar la totalidad de cada muestra para no perder material que puede contener bacilos. Es conveniente además, procesar por separado cada muestra del mismo paciente, sin mezclarlas. Esto incrementa la posibilidad de recuperar bacilos, en especial en el caso en que alguna de las muestras se contamine. A la vez permite verificar si se reitera el aislamiento a partir de distintas muestras del paciente y así resolver dudas que ocasionalmente se pueden presentar en el diagnóstico de tuberculosis o discernir si se está frente a un caso de micobacteriosis

Se aplican distintos procedimientos antes de la siembra según la consistencia, volumen y contaminación de la muestra. El tipo de muestra predominante será seguramente el esputo producido por expectoración espontánea.

Recuperación de material tomado por hisopado

- Abrir el tubo de centrífuga identificado con el número correspondiente a la muestra, colocar en él, con una pipeta estéril, agua destilada en cantidad suficiente para sumergir todo el algodón del hisopo (normalmente 2 o 3 ml)
- Transferir el hisopo a este tubo de centrífuga. Moverlo suavemente tratando de que se desprenda el material en el agua. Quebrar el palillo de hisopo en su parte superior para poder cerrar el tubo de centrifuga con su tapa. Tapar el tubo que originalmente tenía el hisopo
- Agitar en *vortex*. Dejar el hisopo sumergido al menos 15 minutos para permitir que se desprenda la mayor cantidad posible de material
- Destapar el tubo y con una pinza estéril, tomar el palillo del hisopo, presionar el algodón sobre la pared del tubo para escurrirlo, retornar el hisopo dentro del tubo donde fue recibido y apartarlo para descartarlo al finalizar del procesamiento de las muestras Descartar la pinza en el recipiente destinado a descartar pipetas de vidrio, o dentro de una bolsa autoclavable

	Procedimientos previos a la siembra
Muestras que contienen flora normal	
esputo	Decontaminación/ homogeneización
hisopados	Desprendimiento del material en agua destilada Decontaminación. (es posible procesarlos por el método de Kudoh)
contenido gástrico orina sangre menstrual	Centrifugación si el volumen total es mayor a 4 ml Decontaminación
biopsia de intestino	Desintegración en mortero Decontaminación
esputo tratado con bromuro o cloruro de cetilpiridinio 1%	Lavado
Muestras normalmente estériles, tomadas asépticamente [a]	
líquidos tomados por punción pleural, cefalorraquídeo, médula ósea, pericárdico, sinovial, articular, pus, sangre	Centrifugación si el volumen total es mayor a 1 ml
biopsia de tejidos pleural, ganglionar, genital, óseo, etc	Desintegración en mortero

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

Esta recomendación también es válida para procesar sangre de pacientes muy inmunosuprimidos, por ejemplo los que están en estadios avanzados de SIDA, porque pueden estar afectados por varios gérmenes oportunistas que pueden inutilizar el medio de cultivo utilizado para aislar el bacilo de la tuberculosis.

- Tapar el tubo de centrífuga y ubicarlo en la gradilla que contiene los tubos del material que será decontaminado, en el orden que le corresponde, para ser procesado por la técnica de Petroff modificada

Más adelante se describe el método de Kudoh que también es adecuado para hisopados

Concentración de muestras líquidas o semifluidas

Muestras normalmente estériles con volumen menor a 1 ml

- Sembrar directamente y **en su totalidad** distribuyéndolas en los tubos con medios de cultivo. Sembrar 0,5 ml por tubo con medio sólido, para que pueda ser absorbida.

Muestras normalmente no estériles de escaso volumen

- Ubicar el tubo en el orden que le corresponde en la serie de muestras que serán decontaminadas para que sea procesado mediante la técnica de Petroff modificada

Muestras normalmente no estériles de volumen mayor a 4 ml

- Trasvasar el volumen total de cada muestra a uno o más tubos de centrífuga volcando suavemente el contenido del envase dentro de los tubos.
- Centrifugar 15 minutos a 3000 g. Si se utilizan tubos de 50 ml conteniendo más de 15 ml de muestra, prolongar la centrifugación hasta los 30 minutos
- Esperar que se detenga completamente la centrífuga
- Retirar los tubos cuidando no resuspender el sedimento, trasladarlos a la cabina. Dejar reposar los tubos 5 minutos antes de abrirlos
- Abrir el primer tubo centrifugado, descartar su sobrenandante en el recipiente dedicado a este fin con un movimiento suave, sin salpicar, sin tocar la boca del frasco. Limpiar el exterior del tubo con un algodón pañuelo de papel embebido en hipoclorito de sodio 1%, si se mojo eventualmente la pared. Cerrar la tapa del tubo.
- Proceder de igual forma con los siguientes tubos. No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado el anterior
- Agregar 1 ml de buffer pH 6.8 a cada sedimento de orina, contenido gástrico, y sangre menstrual. Abrir los tubos de a uno y cerrarlos inmediatamente después de agregado el buffer, no abrir el siguiente antes de haber cerrado el anterior. Con agitación manual disolver los sedimentos. Reunir en un solo tubo los sedimentos correspondientes a una única muestra, trasvasando el contenido de los tubos suavemente, sin salpicar. Agregar los tubos en la gradilla que contiene la serie de muestras que serán decontaminadas, y proceder a decontaminarlos en el orden que les corresponda según su número
- Agitar el sedimento de las muestras normalmente estériles (líquidos pleurales, cefalorraquídeos, sinoviales, articulares, sangre). Si es necesario, agregar unas gotas de buffer pH 6.8 para disolverlo en volumen suficiente para inocular los tubos o botellas con medios de cultivo utilizados y para realizar el frotis para el examen microscópico. No dejar remanente en el tubo, sembrar todo el precipitado.

Maceración de muestras de tejido tomadas por biopsia

- Trasvasar la muestra suavemente a un mortero estéril de porcelana u otro material autoclavable, sin salpicar. Puede ser necesario el auxilio de una pinza estéril para realizar esta operación. Descartar la pinza en el recipiente destinado a descartar pipetas de vidrio, o dentro de una bolsa autoclavable.
- Agregar 1 ml de buffer pH 6.8 dentro del mortero
- Disgregar el tejido presionando con la mano del mortero y homogeneizar el tejido. Si es resistente a este proceso, agregar arena estéril, volcando los granos suavemente desde el tubo, y volver a disgregar.
- Si el tejido es normalmente estéril y ha sido tomado con asepsia, recoger con una pipeta todo el material macerado, distribuirlo en los medios de cultivo identificados con el número de la muestra, y preparar el frotis en el portaobjetos identificado con ese mismo número

- Si el tejido contiene contaminantes, recoger con una pipeta todo el material macerado, transferirlo al tubo de centrífuga identificado con el número de la muestra que está siendo procesada, ubicar el tubo en el orden que le corresponde en la serie de muestras que serán decontaminadas para que sea procesado mediante la técnica de Petroff modificada
- Si se trata de un material normalmente estéril pero se ignora si fue tomado y mantenido en esterilidad, utilizar la mitad del macerado para la siembra directa y el resto para decontaminar.
- Ubicar el mortero dentro del papel o bolsa donde fue previamente esterilizado y descartarlo dentro del recipiente destinado a autoclavar el material que se va a reciclar

Eliminación de desinfectantes de muestras de esputo

Para eliminar el bromuro o cloruro de cetilpiridinio de las muestras transportadas con estos conservantes

- Transferir la muestra al tubo de centrífuga identificado con el número correspondiente, volcando muy suavemente el contenido del envase, sin salpicar.
- Medir el volumen contenido en el tubo de centrífuga observando la graduación que tiene en su pared
- Agregar el doble de volumen de buffer. Si se opera solamente con tubos de 15 ml y no es posible duplicar el volumen dentro de uno, dividir la muestra en dos tubos, y duplicar el volumen en cada uno de ellos
- Agitar los tubos en *vortex*
- Centrifugar 15 minutos a 3000 g
- Dejar reposar 5 minutos el tubo centrifugado
- Descartar el sobrenadante
- Resuspender el precipitado en buffer pH 6.8
- Sembrar distribuyendo el precipitado en los tubos de medios de cultivo identificados con el número de la muestra que se está procesando
- Preparar el frotis en el portaobjetos identificado con el mismo número

Digestión, decontaminación y concentración por el Método de Petroff modificado

Verificar que la primera serie de muestras a decontaminar no supere a la capacidad del rotor de la centrifuga. Tener en cuenta que el tiempo de contacto con el decontaminante no puede exceder en total los 30 minutos, de manera que normalmente no es posible procesar series de más de 12 muestras**.** Operar con serenidad y movimientos suaves pero ininterrumpidamente para evitar que el tiempo de contacto con el decontaminante se prolongue

- Abrir el primer envase conteniendo una muestra de esputo. Trasvasar todo su contenido en el tubo de centrifuga que le corresponde, con un movimiento muy suave y seguro, o transferirlo con una pipeta.
- Tapar el envase y el tubo de centrífuga
- Proceder de la misma manera con las siguientes muestras, de a una. No abrir un envase ni un tubo de centrifuga sin haber cerrado antes los anteriores
- Tomar la primera muestra transferida sin agregado de decontaminante, verificar su volumen, abrir el tubo, agregar NaOH **4%** hasta duplicar el volumen del esputo guiándose por la graduación exterior del tubo. Cerrar el tubo. Proceder del mismo modo con el resto de las muestras de esputo, con los sedimentos de muestras previamente centrifugadas y macerados de tejidos que requieran decontaminación
- En el caso en que la capacidad de la centrífuga sea un factor limitante, tratar de ubicar pares de muestras con volumen similar. Agregar NaOH **2%** a la muestra de cada par que tenga menor volumen, hasta igualar el volumen de ambos tubos. Este proceso permitirá luego centrifugar el par de tubos con volumen igualado en posición opuesta en el rotor y aprovechar mejor la capacidad de la centrífuga.
- Verificar que todos los tubos estén cerrados herméticamente
- Agitar el primer tubo en *vortex* vigorosamente, y luego colocarlo en una gradilla vacía auxiliar
- Proceder de igual forma con las siguientes muestras, manteniendo el orden de los tubos en la nueva gradilla

- Dejar actuar el decontaminante 5 minutos
- En los siguientes 5 minutos completar los procedimientos que siguen hasta poner en funcionamiento la centrífuga
- Trasladar la gradilla conteniendo los tubos hasta la centrífuga
- Ubicar cada tubo dentro de un portatubos del rotor y balancear con un tubo con igual volumen en la posición opuesta. Si no se encuentra dos tubos con igual volumen, ubicar en frente un tubo con el volumen necesario de agua destilada o etanol 70° Tapar el rotor con la tapa de bioseguridad
- Centrifugar 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C
- Dejar reposar los tubos 5 minutos luego de detenida la centrífuga
- Abrir la tapa de la centrifuga. En caso de sospechar o comprobar algún derrame dentro del contenedor de tubos, autoclavarlo con su tapa de seguridad. De lo contrario, retirarlo muy cuidadosamente, tratando de no resuspender el sedimento, trasladarlo tapado, junto con la gradilla auxiliar a la cabina, y allí destaparlo. Retirar los tubos y ubicarlos en orden según su numero en la gradilla auxiliar, con cuidado de no resuspender el sedimento
- Comprobar que los procedimientos hayan sido realizados con agilidad suficiente como para que el tiempo total de contacto con el decontaminante no exceda los 30 minutos
- Abrir de a uno cada tubo, descartar suavemente el sobrenadante dentro del recipiente destinado a este fin, sin salpicar ni mojar la parte exterior del tubo. Limpiar el exterior del tubo con un pañuelo de papel o algodón embebido en hipoclorito 1% si, eventualmente, se moja la pared. Descartar el pañuelo o algodón dentro de la bolsa destinada a descartar tubos. Dispensar buffer fosfato hasta completar los 15 ml con un frasco dispensador o con una pipeta, sin tocar la boca ni pared del tubo. Cerrar el tubo
- Proceder de igual forma con todos los tubos centrifugados. No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado previamente el anterior
- Comprobar el cierre hermético de las tapas de todos los tubos manipulados
- Agitar vigorosamente en *vortex* cada tubo y ubicarlos en el contenedor de la centrifuga. Cerrar la tapa de bioseguridad de este contenedor
- Centrifugar 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C
- Esperar que se detenga completamente la centrifuga. Dejar reposar los tubos 5 minutos dentro
- Abrir la tapa de la centrifuga. En caso de sospechar o comprobar algún derrame dentro del contenedor portatubos, autoclavarlo con su tapa de seguridad. De lo contrario retirarlo muy cuidadosamente tratando de no Inoculación de los medios de cultivo a la cabina y allí abrir su tapa de bioseguridad. Retirar los tubos y ubicarlos en orden según su numero en la gradilla auxiliar, con cuidado de no resuspender el sedimento
- Abrir de a uno cada tubo, descartar suavemente el sobrenadante dentro del recipiente destinado a este fin, sin salpicar ni tocar bocas o paredes de tubos o frascos. Dispensar buffer fosfato hasta completar el volumen suficiente para sembrar todos los tubos con medios que se empleen.
- Proceder de igual forma con cada tubo centrifugado. No abrir el siguiente tubo sin haber cerrado previamente el anterior
- Resuspender mediante agitación manual el sedimento de cada tubo, reintegrarlo a la gradilla que contiene los tubos con medios de cultivo, en la posición que le corresponde

NOTAS

Si alguna muestra de esputo es muy densa, es conveniente dispensar dentro del mismo envase la solución de NaOH 4% hasta duplicar su volumen, mezclar manualmente con movimiento suave, y transferir luego todo el contenido a un tubo de centrífuga para proseguir con el procedimiento.

Para favorecer la recuperación de bacilos, conviene reducir el tiempo total de contacto hasta los 15-20 minutos y la concentración de NaOH hasta el 2%, si en estas condiciones se verifica que el nivel de contamina-

ción se mantiene por debajo del 4% entre las muestras sembradas en la rutina. Esto es posible en laboratorios que procesan las muestras en el día en que se toman y aplican procedimientos rigurosos.

Si el rotor disponible lo permite, es conveniente la utilización de tubos de centrifuga de 50ml porque se evita una centrifugación. En este caso, se trata la muestra con igual volumen de hidróxido de sólido, se lo deja actuar de 15 a 20 minutos, se agrega buffer pH 6,8 hasta completar los 50 ml, se centrifuga y se siembra el precipitado. No se debe procesar más de 5 ml de muestra en cada tubo de 50 ml, para lograr una neutralización efectiva de la muestra tratada con buffer.

Se puede agregar al buffer unas gotas de solución de rojo de fenol para visualizar la neutralización de la muestra (vira de amarillo a anaranjado)

Inoculación de los medios de cultivo y preparación del frotis

- Abrir el primer tubo de centrífuga. Con una pipeta distribuir todo el sedimento sembrando entre 0,2 y 0,5 ml (6 - 8 gotas) en cada tubo con medio de cultivo identificado con el numero de la muestra. Por ultimo, depositar la última gota sobre el portaobjetos identificado con el numero de la muestras. Cerrar el tubo de centrifuga. Realizar con la misma pipeta el extendido siguiendo los procedimientos descritos en la primera parte de este Manual dedicada a la baciloscopia. Descartar la pipeta en el recipiente destinado a este fin.
- Proceder de igual forma con cada tubo conteniendo las muestras procesadas. No abrir un tubo sin haber cerrado el anterior. Descartar la pipeta o el asa utilizada con cada muestra antes de pasar a la siguiente
- Permitir que los frotis se sequen dentro de la cabina de seguridad biológica
- Repetir todo el procedimiento con las muestras de la siguiente serie, y por ultimo con las de pacientes que se conoce tienen baciloscopia positiva, si las hubiera

Organización del procesamiento simultáneo de distintos tipos de muestras

Los laboratorios con alta carga de trabajo y que reciben habitualmente tipos variados de muestras, deben organizar los procedimientos para hacer el mejor uso posible del tiempo y de la centrifuga

Se presenta a continuación un ejemplo de cómo un mismo operador, muy entrenado, puede organizar el procesamiento de diversos tipos de muestras cuando el trabajo es complejo

a) Ordenar los envases con muestras, portaobjetos, tubos de centrifuga y tubos con medio de cultivo en cuatro gradillas diferentes
   - Gradilla N° 1 muestras normalmente estériles
   - Gradilla N° 2 muestras normalmente contaminadas
   - Gradilla N° 3 muestras de esputo tratadas con cloruro o bromuro de cetilpiridinio
   - Gradilla N° 4 muestras de pacientes con baciloscopia positiva

b) Transferir cada esputo y muestra liquida a su correspondiente tubo de centrifuga

c) Seleccionar de las gradilla N°1 los líquidos tomados por punción que tengan más de 2 ml, y de la gradilla N°2 los tubos con muestras de orinas y contenidos gástricos, si los hubiera. Centrifugarlos

d) Mientras se completa la centrifugación, macerar las muestras de tejidos, si las hubiera, transferir cada muestra a un tubo de centrífuga, ubicar cada tubo en la gradilla N°1 ó N° 2 según corresponda

e) Retirar los tubos de la centrifuga y descartar los sobrenadantes. Insertar en la gradilla N°1 los tubos con precipitados de líquidos normalmente estériles, en el orden que les corresponde. Insertar los tubos conteniendo los sedimentos de orina y contenidos gástricos en la gradilla N°2 en el orden que les corresponde

f) Iniciar tratamiento con la solución de hidróxido de sodio de los sedimentos y muestras ordenados en la gradilla N°2. Dejar actuar, agitar, centrifugar las muestras, descartar el sobrenandante

g) Agregar buffer a los sedimentos de la gradilla N°2 y a las muestras de la gradilla N°3, si las hubiera.

h) Centrifugar las muestras de las gradillas N°2 y 3, descartar los sobrenadantes
i) Sembrar todos los materiales y preparar los frotis
j) Procesar las muestras de la gradilla N° 4 según corresponda
k) Mientras se centrifugan las muestras de la siguiente serie, se colorean los frotis de la serie anterior

Acondicionamiento del material destinado a ser autoclavado

- Asegurar el cierre hermético de la tapa de cada tubo de centrífuga. Colocarlos dentro de una bolsa autoclavable junto con los trozos de algodón, papeles y guantes desechables que eventualmente hubieran sido reemplazados. Descartar en esta misma bolsa todos los frascos de muestras cuyo procesamiento haya finalizado. Ubicar la bolsa en el recipiente destinado a autoclavar material a desechar. Tapar el recipiente
- Ubicar dentro del recipiente destinado a autoclavar material a reciclar el recipiente conteniendo los sobrenadantes y morteros, pinzas, tubos de vidrio eventualmente utilizados para procesar muestras. En este mismo recipiente pueden ser ubicados los tubos de cultivos cuya incubación haya finalizado, luego de leer y registrar el resultado. Cerrar la tapa del recipiente
- Tapar el recipiente utilizado para las pipetas y retirarlo de la cabina
- Limpiar con un paño o algodón embebido en hipoclorito de sodio 1% el exterior de los frascos y recipientes utilizados para dispensar soluciones. Colocarlos en un recipiente para ser enviados para su lavado
- Dejar la cabina de seguridad funcionando durante 5 minutos para purgar el aire contaminado. Decontaminar con algodón embebido en etanol 70-80% la superficie de trabajo dentro de la cabina, sus paredes laterales y la ventana. Descartar el algodón en el recipiente conteniendo material para autoclavar y descartar
- Apagar la cabina de seguridad biológica
- Mantener luego encendido el tubo UV durante dos horas

Incubación de los tubos inoculados

- Inmediatamente después de terminada la siembra y acondicionado el material a autoclavar, trasladar la gradilla conteniendo los tubos sembrados hacia la mesada donde se encuentran la(s) bandeja(s).
- Tomar el primer tubo inoculado, distribuir la siembra en toda la superficie del medio sólido, aflojar ligeramente el cierre de la tapa para permitir intercambio de gases y la absorción de la siembra, ubicar el tubo en la bandeja inclinado
- Proceder de igual forma con cada tubo sembrado
- Rotular cada bandeja con la fecha de inoculación de los tubos que contiene
- Trasladar y ubicar la bandeja a la estufa de incubación a 37 ° C Verificar que los tubos queden con su pico de flauta hacia arriba, sin posibilidad de girar sobre sí mismos, y la siembra bien distribuida en toda su superficie.
- Asegurar el orden de la estufa de incubación, ubicar las bandejas según su rotulo con la fecha para facilitar la inspección, seguimiento de los cultivos y registro de resultados. Verificar que las bandejas no sobresalgan de los estantes, que los tubos estén perfectamente contenidos en sus bandejas, y que el material incubado no se superponga, para evitar accidentes graves.

Fijación y tinción de los frotis

- Fijar y colorear los frotis inmediatamente después de secados, siguiendo las indicaciones detalladas en la primera parte de este Manual dedicada a la baciloscopia. Recordar que no pueden ser mantenidos sin colorear por el riesgo biológico que generan.

Decontaminación de áreas de trabajo y equipos

- Decontaminar con hipoclorito de sodio 1% las mesadas del laboratorio utilizadas, el rotor y los cestos de la centrífuga.
- Quitarse los guantes revirtiéndolos y colocarlos en el recipiente con material a autoclavar y desechar.

- Lavarse las manos

El material (potencialmente) contaminado así acondicionado debe ser autoclavado diariamente 1 hora a 121°C

Lectura e informe de resultados de las baciloscopias

Seguir los procedimientos detallados en la primera parte de este Manual dedicado a la Baciloscopia

OTROS MÉTODOS DE DECONTAMINACIÓN/HOMOGENIZACIÓN

Al considerar la posibilidad de implementar alguna de las dos siguientes opciones para decontaminar/homogeneizar las muestras, revisar las discusión acerca de la Elección del Método de Cultivo según los Recursos Disponibles presentada en este Manual

N-acetil-L-cisteína-hidróxido de sodio (NALC-NaOH)

Utiliza tubos de centrífuga de 50 ml para simplificar el proceso, por lo que se requiere un rotor de centrífuga adecuado para centrifugarlos

- Tratar la muestra con igual volumen de NALC-NaOH durante 15 a 20 minutos, con dos agitaciones intermedias en *vortex*
- Agregar a cada muestra buffer fosfato hasta completar los 50 ml
- Centrifugar a 3000 g 15-20 minutos a 25 - 35°C
- Descartar el sobrenadante
- Agregar 1 ml de buffer a cada tubo, resuspender el precipitado, distribuir el inóculo en los medios de cultivo y preparar el frotis

Se recomienda no procesar más de 5 ml de muestra en cada tubo de 50 ml para lograr la neutralización (la relación del volumen de buffer con el de la muestra tratada debe ser al menos 4:1).

Respetar rigurosamente los procedimientos descriptos para el método de Petroff en el momento de transferir las muestras, dispensar las soluciones, operar con los tubos y centrifugarlos

Inclinar los tubos con medios sólidos inoculados en la forma ya descrita

Las muestras procesadas por este método pueden ser inoculadas en medios neutros a base de huevos. Es el método recomendado para siembra en medios de la serie Middlebrook y en MGIT, incluyendo los utilizados por equipos de lectura automatizada. Debe agregarse a los medios los enriquecimientos y la mezcla de antibióticos aconsejada por los fabricantes.

Método de Kudoh Ogawa modificado

Se recomienda sólo para procesar esputos en laboratorios sin equipamiento adecuado o suficiente para aplicar la técnica de Petroff modificada o de NALC-NaOH. Si aún no se dispone de cabina de seguridad biológica, deberán aplicarse las prácticas y medidas de bioseguridad recomendadas para la realización de la baciloscopia en la primera parte de este Manual

Requiere un hisopo o escobillón estéril de uno 15 mm de longitud y un tubo de vidrio o plástico conteniendo 3 ml de solución de NaOH al 4% por cada muestra a procesar

La contaminación puede resultar superior al 10 % utilizando este método. Se ha descrito que es posible disminuir este nivel de contaminación sin afectar la sensibilidad del método, tratando las muestras de esputo con igual volumen de fosfato trisódico 4,3 % durante 24 horas antes de proceder como sigue

- Abrir el primer envase. Elegir y recolectar con el hisopo las partículas útiles, mucopurulentas del esputo adhiriéndolas al hisopo o escobillón estéril. Cerrar el envase.
- Sumergir el escobillón en un tubo con 3 ml de solución de NaOH 4% durante 2 minutos.
- Retirar el escobillón, sin escurrir, y sembrar con él dos tubos con medio de Ogawa acidificado, con movimientos de rotación y presión
- Descartar el hisopo o escobillón en un recipiente destinado a ser autoclavado.

- Repetir el procedimiento con las siguientes muestras
- Inclinar los tubos inoculados en la forma descrita

Decontaminación con soluciones ácidas

Se puede utilizar acido oxálico para tratar muestras de esputo persistentemente contaminadas, especialmente con *Pseudomonas spp*. Suele suceder con muestras de pacientes con enfermedad fibroquística

- Tratar la muestra con igual volumen de acido oxálico 5%, agitar en *vortex* y dejar actuar durante 15 a 30 minutos (según la resistencia del contaminante) con agitaciones intermedias
- Centrifugar a 3000 g 15 minutos a 25 - 35°C
- Descartar el sobrenadante
- Agregar al sedimento gota a gota solución de NaOH 4% estéril conteniendo rojo de fenol como indicador de pH, hasta que vire su color. No excederse con la base para que el pH quede exactamente en el punto neutro.
- Agregar buffer fosfato pH 6.8 hasta completar los 15 ml
- Centrifugar a 3000 g 15 minutos a 25 - 35°C
- Descartar el sobrenadante
- Agregar 1 ml de buffer a cada tubo, resuspender el precipitado, distribuir el inóculo en los medios de cultivo y preparar el frotis

Respetar rigurosamente los procedimientos descritos para el método de Petroff en el momento de transferir las muestras, dispensar las soluciones, operar con los tubos y centrifugarlos

Para tratar orinas y otras muestras líquidas con contaminación resistente al tratamiento con NaOH 4% también se puede utilizar acido sulfúrico 4% en reemplazo del acido oxálico, aplicando el mismo procedimiento.

AGREGADO DE SUPLEMENTOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO

Para controlar el porcentaje de contaminación, se recomienda el agregado de una mezcla de antibióticos (PACT, PANTA) para la siembra de muestras muy contaminadas en medios de la serie Middlebrook y en MGIT, incluyendo los utilizados en equipos de lectura automatizada. Estos medios también requieren el agregado de enriquecimientos (ADC, OADC).

Las mezclas de antibióticos pueden ser agregadas a los medios sólidos antes de gelificar. Cuando se utilizan ocasionalmente, sólo para ciertas muestras con contaminación resistente, es práctico mezclarlas con el inóculo. También pueden ser agregadas en los caldos en el momento de la siembra. No es recomendable preparar mezclas de antibióticos en laboratorios sin experiencia en pruebas de sensibilidad y sin *freezers* para conservar las soluciones. En todo caso, si los recursos están disponibles, pueden ser adquiridas en forma liofilizada y reconstituidas en el momento de uso.

INCUBACIÓN EN CONDICIONES ESPECIALES

La incubación en atmósfera con $C0_2$ al 10%, al menos durante la primera semana de incubación, es opcional. Resulta ventajosa para el desarrollo más rápido y abundante de *M. tuberculosis*, cuando se utilizan placas de Petri desechables conteniendo agar Middlebrook 7H11. No es recomendable para incubar tubos de vidrio reciclados porque la estufa de cultivo se contamina muy fácilmente con esta atmósfera.

La tapa de las placas de Petri debe ser sostenida con una cinta adhesiva para evitar que por accidente se destapen. Estas placas son colocadas dentro de bolsas de un plástico permeable para evitar que se desequen permitiendo, a la vez, el intercambio de gases, especialmente cuando se incuba en atmósfera de $C0_2$

Cuando se incuba una muestra tomada de piel o una lesión superficial, es conveniente sembrar por duplicado los tubos con los medios utilizados e incubar una serie a 37 °C y otra a temperatura ambiente.

MÉTODO DE PETROFF MODIFICADO

X ml de esputo
+
X ml de NaOH 4%

↓

ajustar las tapas de los tubos,
agitar en *vortex*

dejar actuar 5 minutos

↓

en los siguientes 5 minutos acomodar los tubos en la centrifuga

centrifugar 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C

dejar reposar 5 minutos
controlar que el tiempo total de contacto con el NaOH 4 %
no sobrepase los 30 minutos

↓

descartar el sobrenadante

agregar 15 ml de buffer fosfato pH 6,8
ajustar las tapas de los tubos
agitar en *vortex*

↓

centrifugar 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C
dejar reposar 5 minutos

↓

descartar el sobrenadante

resuspender el sedimento en buffer

distribuir en cada medio de cultivo

y

preparar el frotis con la última gota

Nota es conveniente reducir el contacto con el decontaminante a 15-20 minutos y la concentración de NaOH a 2%, si en estas condiciones se mantiene bajo el nivel de contaminación (menor al 4%)

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS TRATADAS CON BROMURO O CLORURO DE CETILPIRIDINIO 1 %

X ml de esputo tratada

+

X ml de buffer fosfato pH 6,8

ajustar las tapas de los tubos

agitar en *vortex*

↓

centrifugar 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C

dejar reposar 5 minutos

↓

descartar el sobrenadante

resuspender el sedimento en buffer

distribuir en cada medio de cultivo

y preparar el frotis con la última gota

NALC NaOH

X ml de esputo (no mas de 5 ml)

+

X ml de solución NaOH-NALC

↓

ajustar las tapas de los tubos,
agitar en *vortex*

dejar actuar 15 – 20 minutos

completar con buffer fosfato pH 6,8 hasta los 50 ml y mezclar

↓

centrifugar 15 minutos a 3000 g a 25 - 35°C

dejar reposar 5 minutos

↓

descartar el sobrenadante

resuspender el sedimento en buffer

distribuir en cada medio de cultivo
y preparar el frotis con la última gota

MÉTODO DE OGAWA KUDOH

Adherir a un hisopo o escobillón estéril las partículas útiles del esputo

↓

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

↓

Inocular con el hisopo en dos tubos en medio de Ogawa acidificado

PRECAUCIONES PARA EL CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis*

Minimizar el riesgo y la contaminación

- Nunca pipetear con la boca. Utilizar frascos dispensadores autoclavables, pipetas con bulbos y/o propipetas.
- Evitar generar aerosoles al trasvasar suspensiones o descartar sobrenadantes. Operar con movimientos decididos y suaves, sin salpicar. Dejar reposar 5 minutos los tubos agitados o centrifugados antes de abrir
- En caso de derrame, limpiar el exterior de los tubos con un algodón o pañuelo de papel embebido en hipoclorito de sodio 1%
- No tocar la boca o paredes exteriores de los tubos con los frascos o pipetas utilizados para dispensar decontaminante o buffer. Si sucede, reemplazar el frasco o la pipeta y descartarlo como si estuviera contaminado
- No abrir un envase o tubo conteniendo una muestra sin haber cerrado antes el anterior. No dejar destapados una serie de envases o tubos, en ningún paso del procesamiento
- Descartar remanentes de agua destilada, solución decontaminante o buffer utilizados para tratar una serie de muestras, o en todo caso, reutilizarlos en días siguientes después de haberlos autoclavados previamente
- Utilizar una pinza y un tubo distinto con arena estéril para cada muestra que lo requiera
- No tocar con la manga del guardapolvo o bata la boca de envases o tubos conteniendo muestras. Si accidentalmente sucede, quitarse la ropa de trabajo, tratarla como si estuvieran contaminada y reemplazarla

Favorecer el desarrollo del bacilo de la tuberculosis

- Agitar con vortex las muestras en contacto con el decontaminante o el buffer para que la decontaminación y neutralización sean homogéneas y efectivas
- Centrifugar a 3000 g, a no más de 35 ° C.
- No exceder el tiempo de acción del decontaminante indicado en cada técnica
- Utilizar más de un tipo de medio de cultivo toda vez que sea posible
- Mantener controlada y uniforme la temperatura de la incubadora a 36°C+/- 1°C

INSPECCIÓN Y LECTURA DE LAS MUESTRAS CULTIVADAS

CONTROL VISUAL PERIÓDICO

Mantener los tubos en incubación hasta las 8 semanas en el caso de medios a base de huevos, y hasta las 6 semanas en el caso de medios con agar o caldos hasta que se detecte desarrollo.

Inspeccionarlos bajo una buena fuente de luz que permita observar con claridad hasta las colonias más pequeñas, siguiendo el siguiente plan

A los 2-3 días después de sembrados

- Verificar si
  - hay indicios de mala neutralización de la muestra
  - se detecta contaminación
  - la siembra está absorbida y el líquido se ha evaporado

  Cuando quedan restos de hidróxido de sodio en el inóculo, los medios a base de huevos se aclaran hacia un tono amarillento que los diferencia del resto de los tubos sembrados. En tal caso, registrar la observación

  Ciertos microorganismos contaminantes proteolíticos desintegran el medio de cultivo. Otros producen ácido a partir de los constituyentes del medio, bajan el pH y desintegran el verde de malaquita del medio el que, entonces, adquiere color verde oscuro. El bacilo de la tuberculosis no crece en el medio desintegrado ni en el acidificado
- Si se detecta contaminación en toda la superficie de un medio sólido o en un caldo, registrarla en el libro del laboratorio y descartar el tubo/placa/botella
- Si se detecta contaminación o pH inadecuado (viraje hacia al amarillo o verde intenso) en todos los tubos sembrados con la muestra de un paciente, producir de inmediato el informe para comunicar este resultado
- Si se detecta contaminación sólo en un área pequeña de la superficie de un medio sólido, volver a incubar para dar oportunidad a que desarrolle el bacilo de la tuberculosis en la parte no contaminada.
- Si la siembra está absorbida, ajustar la tapa para evitar la desecación del medio. Para hacer mejor uso del espacio de la estufa de incubación, en este momento es posible ubicar los tubos en posición vertical dentro de una caja de plástico u de otro material que pueda ser decontaminado, resistente y segura, y rotulada con la fecha de los tubos que contiene,
- Si la siembra no está absorbida, mantener el tubo inclinado, inspeccionar los días siguientes hasta comprobar que así sea y proceder a ajustar la tapa y eventualmente poner los tubos en posición vertical

Solicitar y procesar una nueva muestra del paciente, toda vez que sea posible, cuando se ha detectado contaminación o pH inadecuado del medio en todos los tubos sembrados

A los 7 días después de sembrados y, luego, una vez por semana

- Identificar tubos/placas o caldos contaminados y proceder como se ha descrito más arriba

  Un tubo contaminado tardíamente puede enmascarar el desarrollo de *M. tuberculosis*, por lo que antes de descartarlo es conveniente hacer un frotis con material del medio y colorear por Ziehl Neelsen. Si se detectan BAAR proceder a decontaminar el cultivo para intentar aislar el bacilo en un nuevo tubo con medio de cultivo. Puede ser necesario recurrir al uso de soluciones ácidas para eliminar ciento tipo de contaminación.
- Identificar los tubos con desarrollo del bacilo de la tuberculosis o de otras micobacterias.
- Registrar el desarrollo en el momento en que se observa y seguir los procedimientos para producir el informe con la menor demora posible

REGISTRO DE RESULTADOS

En el anexo V de este Manual se presenta un modelo de registro

Consignar en el registro del laboratorio el resultado del cultivo en medios sólidos de la siguiente de forma

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

La cantidad de colonias es la suma obtenida en todos los tubos si desarrollan hasta 19 colonias. Si supera este numero, para transformar la lectura en escala de cruces, se promedia el desarrollo observado en todos los tubos. El promedio es exacto cuando se pueden contar las colonias o estimado en el caso en que supere la cantidad posible de contar

Toda vez que se detecte desarrollo, consignar en el registro del laboratorio

- Fecha en la que se observó el desarrollo
- Cuantificación del desarrollo según la escala presentada
- Morfología de las colonias (rugosas, lisas, toda característica peculiar)
- Pigmentación de las colonias (no pigmentada, amarillenta, anaranjada)

Individualizar en el registro del laboratorio cada tubo contaminado en el momento en que sea identificado, para poder luego analizar la magnitud y características de la contaminación que ocurre en la rutina

PROCEDIMIENTOS ESPECIALES DE LECTURA

Agar en placa delgada

Las placas de Petri desechables, que pueden ser pequeñas, de 60 x 15 mm y contener una capa delgada de 5 ml de medio Middelbrook $7H_{11}$, pueden ser observadas frecuentemente y con aumento para acelerar la detección de los cultivos positivos. Es conveniente leerlas dos veces por semana durante un mes Luego de este período es muy poco probable detectar la presencia de *M tuberculosis*, puede presentarse contaminación o las placas pueden resecarse.

Para leerlas, colocarlas invertidas bajo aumento 100 x o 400 x (se puede utilizar el microscopio con ocular 10 aumentos y objetivo de 10 ó 40 aumentos).

- Identificar microcolonias en el agar.
- Observar la morfología de las colonias, sus bordes y la tendencia a formar cordones. Comparar la morfología con la presentada en la ilustraciones de este manual
- Realizar un frotis con las colonias que parezcan ser de micobacterias para comprobar la presencia de BAAR.
- Corroborar el aislamiento de *M. tuberculosis* con la identificación del germen y con la morfología de las colonias que más tardíamente pueden desarrollar en los medios a base de huevos

Lectura manual de medios con sensores del desarrollo

El MGIT (*Mycobacteria growth indicator tube*) contiene caldo Middlebrook 7H9 y una base de pentahidrato de rutenio como indicador del desarrollo. Al hacer incidir luz UV, que puede ser emitida por una simple linterna o por el equipo provisto por el fabricante, el indicador fluoresce si algún microorganismo con metabolismo activo ha consumido O_2. De manera que es posible detectar la presencia de una micobacteria en desarrollo antes de que el medio se ponga turbio

El MB *Redox* es medio de Kirchner conteniendo una sal de tetrazolio (incolora) que puede ser reducida a formazán (rosa-rojo-violeta) cuando desarrolla un microorganismo y consume O_2.

Siempre es necesario realizar un frotis con una muestra del medio para comprobar la presencia de BAAR. La observación de gruesos cordones de BAAR es indicativa de *M. tuberculosis*

Lectura automatizada de caldos

Los equipos controlan automáticamente las botellas o tubos inoculados mientras los mantienen en incubación y emiten una señal cuando se detecta desarrollo. Es necesario seguir las indicaciones del fabricante de cada equipo

Siempre se requiere realizar un frotis con una muestra del medio para comprobar la presencia de BAAR. La observación de gruesos cordones de BAAR es indicativa de *M. tuberculosis*

Desarrollo en MGIT (Mycobacteria Growth Indicador Tube)

En todos los casos la identificación certera de *M. tuberculosis* se realiza con los procedimientos descritos en el siguiente capitulo

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR CUANDO SE DETECTA DESARROLLO

Si se observa		
en cualquier momento	contaminación total	Informar de inmediato cultivo contaminado Solicitar nueva muestra
en la primera semana de incubación	desarrollo abundante de micobacterias, pigmentado o no	Proceder según se detalla en (a)
después de la segunda semana de incubación	características típicas de *M. tuberculosis* colonias no pigmentadas (crema) rugosas como migas de pan o coliflor	Informar de inmediato - cultivo positivo - el grado de positividad con escala de cruces - con características compatibles con *M.tuberculosis*
	desarrollo que puede o no ser BAAR ó colonias/ napa lisas, sin pigmentación, que parecen ser micobacterias	En cabina de seguridad biológica - identificar o descartar la presencia de BAAR en un frotis - si son BAAR iniciar los procedimientos para confirmar o descartar la presencia de *M.tuberculosis.* - si es *M. tuberculosis* producir informe de inmediato - si no es *M. tuberculosis* proceder según se detalla en (a)
	colonia o napa pigmentada (amarilla o anaranjada)	En cabina de seguridad biológica - identificar o descartar la presencia de BAAR en un frotis si son BAAR proceder según se detalla en (a)

(a) Informar explícitamente que se han detectado micobacterias diferentes de *M. tuberculosis* y descartar la importancia clínica del aislamiento a menos que

1. el paciente sea inmunosuprimido
2. el aislamiento haya sido hecho a partir de una muestra pulmonar de un paciente con antecedentes de enfermedad pulmonar crónica
3. el aislamiento haya sido obtenido a partir de una muestra con baciloscopia positiva
4. el aislamiento haya sido hecho a partir de una muestra de tejido o líquido normalmente estéril
5. sea el segundo o tercer aislamiento con las mismas características obtenido a partir de distintas muestras de un mismo paciente

En los dos primeros casos, solicitar y cultivar nuevas muestras del paciente, si no han sido ya procesadas, para investigar si está afectado por una micobacteriosis.

El aislamiento de una micobacteria ambiental en las situaciones 3, 4 y 5 da sustento bacteriológico al diagnóstico de micobacteriosis, y por lo tanto en estos casos conviene completar la identificación de la micobacteria aislada tanto como que sea posible

SELECCIÓN DE CULTIVOS POSITIVOS PARA IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Identificar y encauzar para identificación y prueba de sensibilidad los aislamientos de los pacientes que los requieren, según se detalla a continuación

Desarrollo en el cultivo	**Caso**	**Encauzar el cultivo para**
con características compatibles con *M. tuberculosis* ó identificado como *M. tuberculosis*	— Paciente investigado para diagnóstico y antecedentes de tratamiento con drogas antituberculosas o expuesto a infección por bacilos resistentes a las drogas (contactos de casos con tuberculosis resistente, internados o trabajadores de instituciones de salud o de prisiones donde se registran casos con tuberculosis **multirresistente)** — Paciente investigado para control de tratamiento con baciloscopia positiva luego de finalizado el segundo mes de tratamiento, o después	**Prueba de sensibilidad**
con características no compatibles con *M. tuberculosis* ó identificado como una micobacteria diferente de *M. tuberculosis*	— paciente inmunosuprimido — aislamiento de una muestra pulmonar de un paciente con antecedentes de enfermedad pulmonar crónica — aislamiento de una muestra con baciloscopia positiva — aislamiento de una muestra de tejido o líquido normalmente estéril — segundo o tercer aislamiento con las mismas características obtenido a partir de distintas muestras de un mismo paciente	**Identificación**

En el caso en que el laboratorio no realice la identificación y/o prueba de sensibilidad, derivar al laboratorio de referencia acondicionando el o los tubos positivos como se detalla en el Anexo I de este Manual

Tener en cuenta que el laboratorio de referencia requerirá al menos 20 colonias para realizar la prueba de sensibilidad, de manera que puede ser necesario incluir más de un tubo sembrado con una misma muestra si el desarrollo es escaso

Para la identificación es necesario enviar todos los aislamientos obtenidos con distintas muestras del paciente con el fin de verificar si todos corresponden al mismo germen

En el Anexo V se presenta un modelo de formulario para derivar los aislamientos al laboratorio de referencia. Es posible que sea necesario recolectar la información adicional a la disponible para estos casos especiales, no frecuentes en la rutina de trabajo. De esta forma los estudios necesarios para cada caso podrán ser encauzados haciendo el mejor uso posible de los recursos diagnósticos disponibles en el laboratorio de referencia

INFORME DE RESULTADOS

Transcribir el resultado consignado en el registro de laboratorio en el formulario adoptado por el Programa de Control de la Tuberculosis para el informe de cultivos. En el Anexo V se presenta un modelo de informe

Utilizar la escala arriba descrita para cuantificar los resultados positivos. Si la morfología de las colonias y, eventualmente, el examen microscópico de los bacilos desarrollados, según se describe en el siguiente capitulo, permiten orientar la identificación agregar según corresponda alguna de las siguientes observaciones

- Con características compatibles con *Mycobacterium tuberculosis*
- Con características no compatibles con *Mycobacterium tuberculosis*, en identificación

Informar los cultivos positivos y los totalmente contaminados en el mismo día en que son detectados

Cuando la lectura es visual, informar los cultivos negativos al finalizar la octava semana de incubación de los medios a base de huevos, y al finalizar la sexta semana los medios con agar o caldos. Seguir las instrucciones de los fabricantes en el caso de realizarse lectura automatizada de caldos

DESCARTE DE TUBOS INOCULADOS

Descartar los tubos, frascos, placas con medios inoculados, con o sin desarrollo, en un recipiente donde serán autoclavados durante 1 hora a 121 °C, antes de ser reciclados. Las placas deben ser ubicadas dentro de bolsas autoclavables para poder ser desechadas luego del autoclavado.

"¿Es tuberculosis o no?" es la pregunta a la que hay que responder rápidamente para orientar la terapéutica y las medidas preventivas y de control, toda vez que se identifique la presencia de BAAR en un cultivo.

Si es tuberculosis, se aplicará o mantendrá el tratamiento con drogas antituberculosas.

Si, excepcionalmente, se han aislado BAAR que no son *M. tuberculosis,* se considerará un aislamiento banal a menos que se cumplan las siguientes dos condiciones:

1. el paciente presenta síntomas y signos clínicos de una micobacteriosis (muy similares a los de la tuberculosis)
2. se reitera el aislamiento de una misma especie de micobacteria ambiental a partir de distintas muestras del paciente con un número considerable de colonias (más de 5)
   ó
   se aísla la micobacteria ambiental a partir de una muestra con baciloscopia positiva
   ó
   se aísla la micobacteria ambiental a partir de una muestra normalmente estéril

Si se concluye que es un caso de micobacteriosis, es posible aplicar un esquema terapéutico activo para casi todas las micobacterias ambientales, ajustarlo ligeramente según la micobacteria sea de desarrollo lento o rápido, y evaluar luego si es conveniente algún cambio cuando se conoce la especie aislada y su sensibilidad a algún antibiótico clave, en el caso en que sea posible completar estos estudios.

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS

Los medios sólidos evidencian el desarrollo de las micobacterias con cierto retardo con relación a los líquidos, pero en cuanto se detecta el desarrollo es posible diferenciar las colonias con características de *M. tuberculosis* con lo que, si se tiene experiencia, es posible orientar con mucho acierto si se ha aislado el bacilo de la tuberculosis.

Como se ha dicho, las colonias de *M. tuberculosis* son habitualmente rugosas, sin pigmentación, y secas si se ha absorbido bien en el medio la humedad propia de la muestra y las soluciones utilizadas para procesarla.

M. kansasii es una micobacteria ambiental que puede tener colonias rugosas con aspecto parecido a *M. tuberculosis* pero evidencian pigmentación amarilla cuando los cultivos jóvenes son expuestos a la luz, son fotocromógenas. En caso de sospecha, para investigar esta propiedad

proceder de la siguiente forma con un aislamiento recién desarrollado

- Proteger un tubo con el aislamiento con un papel opaco
- Exponer otro tubo a una lámpara de unos 40 watts a una distancia de 25 cm. durante una hora aproximadamente
- Incubar ambos tubos durante una noche a 37° C.
- Comparar la pigmentación de ambos tubos.

Cuando la micobacteria es fotocromógena se verá el tubo protegido sin pigmentación o con pigmentación irregular, y el tubo expuesto a la luz francamente pigmentado, de color amarillo

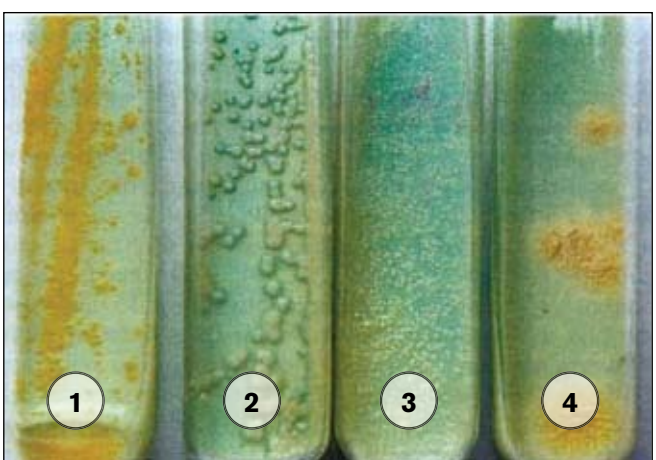
Las colonias de *M. bovis* y algunas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniacida son más planas y lisas. Cuando el medio de cultivo está muy húmedo, las colonias de cualquier micobacteria aparecen lisas. Entonces si las colonias desarrollan lentamente, no tienen pigmentación, son lisas, pequeñas o brillantes, se presenta la duda acerca de si lo que se ha aislado es una micobacteria ambiental.

Sin duda alguna es una micobacteria ambiental si se detectan colonias de BAAR con algún tipo de pigmentación (desde ligeramente amarilla hasta anaranjada fuerte) o con abundante desarrollo en medios a base de huevos durante la primera semana de incubación. Muy excepcionalmente *M. tuberculosis* puede aparecer tan precozmente si el inóculo es muy alto.

Si se sospecha el diagnóstico de micobacteriosis, la identificación debe ser proseguida con todos los aislamientos obtenidos con distintas muestras del paciente. Está fuera del alcance de este Manual la identificación de micobacterias diferentes a las del complejo *M. tuberculosis*

PRECAUCIONES PARA PROCESAR CULTIVOS POSITIVOS

- Realizar todos los procesos que siguen en cabina de seguridad biológica.
- Descartar el asa, si es desechable, o esterizarla muy escrupulosamente, si es reutilizable, después de procesar un cultivo y antes de tomar otro
- No utilizar llama para esterilizar asas dentro de la



Cultivo en Löwenstein-Jensen
1. Micobacteria ambiental cromógena
2. Micobacteria ambiental de rápido desarrollo
3. Micobacteria ambiental de lento desarrollo
4. *Mycobacterium tuberculosis*

Cuerdas de *Mycobacterium tuberculosis*

cabina. Esterilizar las asas de níquel-cromo dentro del tubo de un incinerador eléctrico
- Dejar enfriar el asa de níquel cromo después de esterilizarla y antes de reutilizarla para no dañar la viabilidad y metabolismo de las micobacterias que se están estudiando
- No abrir un tubo o frasco con cultivo positivo sin antes haber cerrado el anterior cuando se está identificando una serie de aislamientos
- No tocar con pipetas o frascos dispensadores de reactivos la boca o paredes de los tubos con cultivo. Descartarlos junto con el material potencialmente contaminado en el caso en que por accidente suceda

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

- Colocar con el asa estéril una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos identificado con el número del cultivo. Desechar el asa en un recipiente con hipoclorito de sodio 1% si es plástica, o si no esterilizarla en incinerador y permitir que se enfríe
- Abrir la tapa del tubo con desarrollo, tomar con el asa escasa cantidad de material, cerrar el tubo
- Depositar el material sobre la gota de agua en el portaobjetos. Realizar el frotis extendiendo cuidadosamente el material
- Dejar secar, fijar y colorear el extendido siguiendo las indicaciones dadas en la primera parte de este Manual dedicado a la baciloscopia
- Observar en el microscopio, comprobar la presencia de BAAR, descartar la presencia de contaminantes no BAAR
- Si se observan BAAR, buscar agrupaciones de bacilos que se disponen en paralelo formando "cuerdas", más o menos gruesas.
- Verificar si se observan bacilos muy largos, filamentos con o sin ramificación, acido alcohol resistencia parcial.

La presencia de "cuerdas" es una indicación más de que lo que se ha aislado es *M. tuberculosis*. Las micobacterias ambientales se disponen en forma desagregada, más separadas entre sí, y suelen ser más cocoides.

Si en los frotis realizados del cultivo se observan BAAR y contaminantes, resuspender varias asas del desarrollo obtenido en agua destilada estéril y proceder a decontaminarlo siguiendo los procedimientos descritos para tratar muestras. Puede ser necesario recurrir a la decontaminación utilizando ácidos en estos casos

La presencia de filamentos y ácido alcohol resistencia parcial puede indicar la presencia de una micobacteria de rápido desarrollo u otro actinomicetal

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Para un laboratorista experimentado, la morfología macro y microscópica de las colonias, rugosas, no cromógenas, de lento desarrollo, con bacilos que se agrupan en cuerdas, pueden indicar con mucho acierto la presencia del bacilo de la tuberculosis en un cultivo positivo. Sin embargo la identificación certera de *M. tuberculosis* se alcanza mediante las pruebas bioquímicas que se presentan a continuación o por métodos moleculares

Prueba de niacina

Principio

La niacina (ácido nicotínico) juega un rol vital en las reacciones de oxido-reducción que ocurren durante el metabolismo de todas las micobacterias. Aunque todas ellas producen niacina, la mayoría lo hace en cantidad moderada y la emplea en la síntesis de otras moléculas. Sólo *M. tuberculosis* la produce muy activamente y la acumula en gran cantidad porque no puede procesarla posteriormente.

La acumulación de niacina puede ponerse en evidencia con mayor seguridad luego de 3-4 semanas de la aparición de las colonias y cuando el desarrollo es abundante (mas de 50 colonias). Si se observa desarrollo abundante en más de un tubo sembrado con una muestra de un paciente, para agilizar el diagnóstico la prueba puede ser realizada cuando se detecta el cultivo positivo. Pero es necesario considerar que el resultado puede ser resultar negativo porque el cultivo es muy joven y

aún no se ha acumulado suficiente cantidad de ácido nicotínico en el medio. Ante un resultado negativo de un cultivo joven, es necesario repetir la prueba con otro tubo incubado hasta las 3-4 semanas

Está descrito que excepcionalmente *M.simiae* y *M.chelonae* pueden tener resultado positivo con la prueba de niacina. Es poco frecuente que así sea y, de todas formas, la primera especie se distingue de *M. tuberculosis* porque evidencia pigmentación amarilla y la segunda porque desarrolla rápidamente. También algunas cepas de BCG pueden tener resultado positivo débil

Son más consistentes los resultados con cultivos obtenidos en medios a base de huevos. La incorporación de aspartato de potasio al 0.1% en medio Middelbrook 7H10 favorece la detección de niacina en este medio.

En la práctica, el calor facilita la detección de este metabolito. Puede aplicarse incubando el medio de cultivo bañado con agua, agregando agua caliente dentro del tubo con medio de cultivo o autoclavando el tubo conteniendo agua. El último procedimiento minimiza el riesgo biológico para el caso en que la cabina de seguridad biológica en uso no tenga extracción de aire hacia el exterior de laboratorio y el revelado de la reacción deba ser trasladado a otra cabina con extracción de vapores

Es la prueba bioquímica más útil para diferenciar con certeza a *M. tuberculosis*. Pero requiere la manipulación de reactivos tóxicos.

Procedimientos

- agregar 1,5 ml de agua destilada estéril con una pipeta en el tubo de medio a base de huevos conteniendo el desarrollo del aislamiento, preferentemente con desarrollo abundante, de 3- 4 semanas
- repetir la operación con un tubo conteniendo buen desarrollo, de no menos de 4 semanas. de una cepa de referencia de *M. tuberculosis,* preferentemente H37Ra (control positivo) y un tubo sin inocular (control negativo)
- romper el medio con el asa para facilitar la solución de los metabolitos del medio de cada tubo
- dejar el tubo inclinado al menos 15 minutos y autoclavarlo durante 15 minutos
- extraer 0,5 ml del líquido con una pipeta y transferirlo a un tubo de ensayo con tapa a rosca, estéril
- revelar la reacción, en una cabina de extracción de vapores, agregando 0,5 ml de o anilina 4% (o de la sal sódica de PAS 1%) y 0,5 ml de bromuro de cianógeno a cada tubo, cerrar el tubo y agitar manualmente
- permitir que se produzca la reacción durante los siguiente 5 minutos
- registrar el resultado

Lectura e interpretación

La reacción positiva identifica la presencia de niacina en alta concentración en el medio de cultivo y se visualiza con coloración amarilla

Controles
M. tuberculosis: **resultado positivo**
M. bovis y micobacterias ambientales: **resultado negativo**
La reacción del control negativo no debe desarrollar color.

Existen tiras de papel fabricadas por la industria con los reactivos impregnados para realizar esta prueba, que disminuyen el riesgo de manipulación e inhalación los reactivos tóxicos. En algunos países son de difícil importación. En el caso en que sean accesibles se procede de la siguiente forma

- agregar 0,5 ml de agua destilada estéril con una pipeta en el tubo de medio a base de huevos con desarrollo abundante de por lo menos de 3 semanas
- sumergir una tira en el tubo de cultivo utilizando un pinza estéril y tapar el tubo
- agitar manualmente
- dejar reposar 15 minutos
- registrar el resultado siguiendo las indicaciones del fabricante

Antes de enviar a autoclavado los tubos en los que se hizo la reacción, con los reactivos separados o utilizando tiras, doblar el volumen del tubo con solución de hidróxido de sodio 10% para evitar la formación de ácido cianhídrico que es altamente tóxico

Inhibición de catalasa a 68 °C

Principio

La catalasa es una enzima que tienen los microoganismos para defenderse, detoxificando los compuestos superoxigenados generados por las células del hospedador o durante la respiración. La catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

La actividad de catalasa de *M. tuberculosis* y *M. bovis* resulta inhibida a 68ºC. El resto de las micobacterias (con la una única excepción de *M. gastri* que es muy poco frecuente) conservan la actividad de catalasa después del calentamiento a 68ºC. La termolabilidad de la catalasa es por lo tanto, junto con la acumulación de niacina, una característica muy útil para diferenciar a *M. tuberculosis* del resto de las micobacterias

Es la prueba bioquímica que le sigue en importancia a la de niacina para identificar a los integrantes del complejo *M. tuberculosis.* Es sencilla de realizar, no genera riesgos por toxicidad y utiliza reactivos normalmente disponibles en un laboratorio de bacteriología. Como detecta una actividad enzimática, puede ser realizada en cuanto se detecta el desarrollo del cultivo

Procedimientos

- utilizar aislamientos jóvenes, de hasta de 3 semanas de desarrollo.
- identificar dos tubos conteniendo cada uno 0,5 ml de buffer fosfato pH 6,8 estéril con el número de cada aislamiento a identificar
- identificar otros dos tubos con buffer con el número de una cepa de referencia de *M. avium* que será utilizado como control de la prueba
- identificar otros tubos con buffer con el número de una cepa de referencia de *M tuberculosis* preferentemente H37Ra, que será utilizado como segundo control de la prueba
- transferir una asa abundante de cada cultivo a cada uno de los dos tubos con buffer identificados con su número
- dejar sin sembrar dos tubos identificados como control negativo
- dejar una serie de tubos conteniendo cada aislamiento a temperatura ambiente, y colocar la otra serie de tubos a baño maría a 68ºC durante 20 minutos.
- dejar enfriar a temperatura ambiente los tubos incubados
- ordenar de a pares los tubos correspondientes a cada aislamiento en una gradilla
- agregar a cada uno de los tubos 0,5 ml de una mezcla preparada en el momento con partes iguales de la solución acuosa de Tween 80 al 10% y agua oxigenada 100 volúmenes (30%).
- comprobar que las tapas de los tubos estén bien cerradas
- observar a trasluz si se desprenden burbujas desde la masa bacilar hacia la superficie del líquido dentro de cada tubo, evitando generar burbujas por agitación o movimientos bruscos que pueden confundir el resultado
- volver a observar los tubos negativos a los 20 minutos para verificar si no hay actividad de catalasa
- registrar los resultados

Lectura e interpretación

El resultado positivo se identifica por el desprendimiento de burbujas. Indica actividad enzimática que está descomponiendo el peroxido de hidrogeno.

Controles
M. tuberculosis es positivo a temperatura ambiente y negativo luego de calentar a 68 ºC
M. avium es positivo a temperatura ambiente y luego de calentar a temperatura ambiente

Los tubos sin inóculo deben ser negativos a las dos temperaturas. De lo contrario el buffer o los reactivos pueden estar contaminados

Algunos aislamientos de *M.tuberculosis* resistentes a la isoniacida pueden tener mutada esta característica.

Reducción de nitrato

Principio

Aun cuando *M. tuberculosis* prefiere el amonio y la asparagina, puede utilizar el nitrato y nitrito como fuente de nitrógeno. Tiene una enzima unida a la membrana celular que rápida y activamente reduce nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2). Esta actividad enzimática es muy estable y otorga una herramienta que ayuda a la identificación de distintas especies. En particular *M. tuberculosis* y algunas micobacterias ambientales tienen actividad de nitrato reductasa mientras que *M bovis* y BCG no debido a mutaciones que determinan la inactividad de los genes que la codifican

Esta prueba también puede ser realizada en cuanto se detecta el desarrollo del microorganismo

Procedimientos

- utilizar aislamientos de hasta 3 semanas de desarrollo
- transferir y disgregar con un asa estéril 1 asa con abundante masa bacilar de cada cultivo a identificar en un tubo conteniendo el sustrato ($NaNO_3$ 0,01 M), identificado con el número del aislamiento a estudiar
- repetir el procedimiento con una cepa de referencia de *M. tuberculosis*, preferentemente H37Ra (control positivo)
- comprobar que las tapas de todos los tubos estén bien cerradas
- agitar suavemente
- agregar a la serie un tubo sin inocular identificado como control negativo
- incubar todos los tubos a 37 °C durante 3 horas
- agregar luego a cada tubo
  - 1 gota de *Solución A*: Ácido clorhídrico 1:1 en agua
  - 2 gotas de *Solución B*: Solución acuosa de sulfanilamida 0,2%
  - 2 gotas de *Solución C*: Solución acuosa de N-naftil etilendiamina 0,1%
- comprobar que los tubos estén bien cerrados
- agitar manualmente
- leer de inmediato y registrar el resultado

Lectura e interpretación de resultados

Los resultados pueden ser

Positivo: color rosa (de tono más fuerte que el control negativo) a fucsia. Indica que se ha reducido el nitrato presente en el sustrato

Negativo: sin color

Dudoso: color rosa muy tenue y ligeramente superior al del control negativo. En este caso repetir la prueba con reactivos recientemente preparados y cultivos frescos.

Esquema de diferenciación de *M. tuberculosis* de las micobacterias ambientales

	M. tuberculosis	Micobacterias ambientales
Velocidad de desarrollo	lenta (a partir de la tercera semana luego de inoculada una muestra en medio a base de huevos)	lenta o rápida
Aspecto macroscópico de la colonia	rugosa no pigmentada	lisa pueden tener pigmentación
Aspecto microscópico	bacilos dispuestos en “cuerdas”	bacilos muy largos y filamentosos o cortos, cocoides, mayormente desagregados
Niacina	positiva	negativa
Catalasa a 68 °C	negativa	positiva
Reducción de nitrato	positiva	positiva/negativa

Controles
M. tuberculosis es positivo
Los tubos sin inocular deben ser negativos, de lo contrario pueden estar contaminados

En el caso en que los controles de cualquiera de las pruebas no den los resultados esperados, es necesario repetirla para toda la serie de cultivos investigada en ese día después de renovar los reactivos

Se sospecha la presencia de *M. bovis* cuando se observan colonias escasas muy pequeñas y lisas o ausencia de desarrollo en medio de Lowenstein Jensen, y desarrollo más abundante en medio Stonebrink. *M bovis* tiene los mismos resultados de catalasa que *M. tuberculosis*, pero tiene resultados negativos para niacina y nitrato reducción

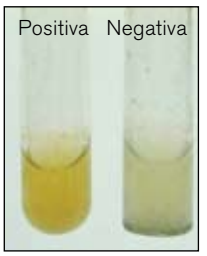
En caso de ser necesario, solicitar al laboratorio de referencia completar la identificación de todo aislamiento

- con catalasa negativa a 68 °C y resultados de niacina o nitrato negativos
- de micobacterias ambientales con posible rol etiológico

PRUEBAS MOLECULARES

La identificación de las especies de micobacterias más frecuentes en muestras clínicas por medio de la hibridación con sondas de ácidos nucleicos específicas es muy precisa y es aceptada en reemplazo de las pruebas bioquímicas. Aceleran mucho la identificación de la micobacterias ambientales potencialmente patógenas. En cambio, para identificar el complejo *M. tuberculosis* no son tan convenientes. Tienen un costo mucho mayor que el de las pruebas bioquímicas y no aceleran significativamente el resultado porque requieren abundante desarrollo en el cultivo para producir un resultado certero.

Es posible adelantar el resultado si se amplifica en cultivos precoces alguna región especifica del cromosoma del bacilo que puede ser luego identificada con sondas, o analizando los fragmentos que resultan luego de tratamiento con enzimas que lo cortan. Sin embargo, no se recomienda la incorporación de métodos que requieran transferir segmentos de ácidos nucleicos amplificados a otro tubo o a un soporte cualquiera, en laboratorios que no cuenten con los complejos requerimientos para realizarlo (disponibilidad de tres laboratorios separados, material descartable y protegido de aerosoles en cada laboratorio, personal muy entrenado, ropa de uso exclusivo en distintas áreas, etc.). La descripción de estas exigencias escapa a los objetivos de este Manual



Prueba de niacina

Controles

positivo *M. tuberculosis*, preferentemente cepa H37 Ra

negativo: un tubo con medio a base de huevos sin inocular

agregar 1,5 ml de agua destilada estéril dentro del tubo con abundante desarrollo en medio a base de huevos

↓

punzar el medio con un asa

↓

dejar el tubo inclinado a temperatura ambiente 15 minutos

↓

autoclavarlo a 121 °C, 15 minutos

↓

transferir 0,5 ml del líquido a un tubo de ensayo

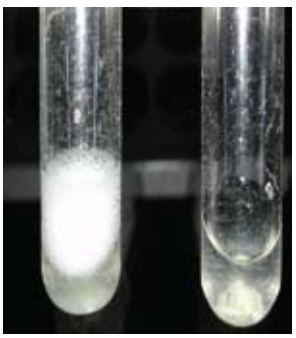
↓

agregar
0,5 ml de PAS sódico 1%
o de anilina 4%
y 0,5 ml de bromuro de cianógeno

↓

dejar 5 minutos a temperatura ambiente y registrar el resultado

Nota : existen tiras con los reactivos impregnados, de origen comercial, que disminuyen el riesgo de operaciones con reactivos tóxicos


Catalasa inhibida a 68 °C

Inhibición de catalasa a 68°c

Controles

positivo a temperatura ambiente, negativo 68 °C
M. tuberculosis, preferentemente cepa H37Ra
positivo a temperatura ambiente, positivo 68 °C
M. avium
negativo a temperatura ambiente y a 68 °C
un tubo con medio a base de huevos sin inocular

transferir un asa abundante de masa bacilar de un cultivo de hasta 3 semanas en cada uno de dos tubos con 0,5 ml de buffer fosfato pH 6,8 estéril

↓

dejar una serie de tubos a temperatura ambiente

incubar la otra serie 20 minutos a 68 °C

↓

dejar enfriar los tubos incubados

↓

agregar a uno de los tubos 0,5 ml de una mezcla con partes iguales de *Tween* 80 10% y agua oxigenada 100 volúmenes (30%)

↓

observar el desprendimiento de burbujas

verificar si los tubos negativos permanecen negativos a los 20 minutos

Negativo Positivos

Reducción de nitratos

Controles

positivo *M. tuberculosis*, preferentemente cepa H37 Ra de hasta 3 semanas

negativo un tubo de sustrato sin inocular

transferir un asa abundante de masa bacilar de un cultivo de hasta 3 semanas en un tubo con de $NaNO_3$ 0,01 M

↓

agitar manualmente

incubar a 37 °C durante 3 horas

↓

agregar
1 gota de Solución A: Acido clorhídrico 1:1 en agua
2 gotas de Solución B: Solución acuosa de sulfanilamida 0,2%
2 gotas de Solución C: Solución acuosa de N-naftil etilendiamina 0,1%

↓

agitar manualmente

registrar los resultados de inmediato

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

El director del laboratorio es responsable de establecer y analizar los resultados de los controles internos y de realizar las correcciones necesarias cuando se detectan deficiencias

Debe insertar en la rutina de trabajo un sistema de controles regulares y continuos de los puntos críticos.

El control de calidad interno comprende

- la evaluación de
  - materiales, equipos, reactivos
  - el desempeño del personal
  - los procedimientos
  - la precisión y oportunidad de los informes
  - la aplicación adecuada del cultivo
  - el rendimiento del cultivo
- el seguimiento de los resultados de los controles de calidad
- las medidas correctivas a aplicar cuando la imprecisión del resultado excede los límites considerados aceptables o se producen demoras evitables

MEDIOS DE CULTIVO, EN PARTICULAR A BASE DE HUEVOS

Los controles son necesarios tanto cuando se prepara el medio en el propio laboratorio como cuando es adquirido a una firma comercial

Aspecto

Color: tubos de un mismo lote que presentan distinta intensidad de verde evidencian mala homogenización o residuos en los tubos. Un verde muy oscuro evidencia exceso de verde de malaquita o pH muy ácido. Medios muy amarillentos pueden indicar defecto de verde de malaquita o pH muy alcalino. En el caso de los caldos, verificar la ausencia de cualquier tipo de turbidez

Consistencia: si el medio se desintegra fácilmente, la temperatura de coagulación no es suficiente. Esto puede ser constatado golpeando sobre la mano uno o dos tubos extraídos al azar

del equipo de coagulación. Los tubos con poca consistencia no son adecuados para hacer repiques.

Textura/homogeneidad: si se evitó la formación de burbujas al dispensar y aparecen luego de coagular, es posible que el medio haya estado sometido a temperatura excesiva y por lo tanto haya perdido calidad. Tampoco deben verse grumos, indicadores de mala homogeneización

Sensibilidad:

Problemas graves pueden ser detectados sembrando una dilución 1/10.000 de una suspensión de bacilos de *M. tuberculosis* con turbidez igualada a la de una suspensión BCG de 1 mg/ml. Inocular 0,2 ml en cada uno de 5 tubos de medio de un lote anterior, y en 5 tubos del lote nuevo, tomados al azar. Si el número de colonias obtenidas en el lote recién preparado (o recién adquirido) es significativamente menor al obtenido con el lote tomado como referencia, la sensibilidad es inadecuada.

En el caso de caldos, se compara el numero de días que demora en crecer en el nuevo lote y en el lote de referencia. En caso de utilizar equipo de lectura automatizada, se sospechará baja sensibilidad del medio si la señal emitida con el nuevo lote de medio es mucho más tardía que la obtenida con el lote de referencia.

Otro control útil consiste en sembrar regularmente las muestras respiratorias de diagnóstico con baciloscopia positiva aunque el cultivo no sea necesario para el paciente. La positividad del cultivo (en escala de cruces) debe ser igual o mayor a la positividad de la baciloscopia (también en escala de cruces)

Esterilidad

No debe observarse desarrollo alguno después de incubar tubos tomados de cada nuevo lote al azar, a 37°C durante 48 hs, y tampoco luego de dejarlos 48 hs adicionales a temperatura ambiente.

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

En el anexo V se presenta un modelo de formulario para mantener este registro que permite individualizar lotes deficientes y descartarlos, seguir la calidad de los lotes y cuantificar el consumo del laboratorio

Para medios a base de huevos, a los 20 días de incubación se podrá decidir si el control de sensibilidad arroja resultado satisfactorio. Si no lo es, se identificará el material sembrado en él desde que fue puesto en uso, se anularán los resultados negativos que se obtengan con ese lote y se repetirán los cultivos que quedaron comprometidos.

En este registro, los tiempos de incubación serán adaptados en el caso de tener bajo control caldos incluyendo los utilizados para equipos de lectura automatizada

Descartar lotes no homogéneos, contaminados, expuestos a altas temperaturas o con sensibilidad baja.

Una vez al mes, quien supervise las tareas técnicas, controlará que se estén cumpliendo los procedimientos adecuados en la preparación y conservación de reactivos y medios. Agregará un control de pH en la solución salina de los medios y controlará el proceso de esterilización usando indicadores de temperatura.

ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO, CALIDAD DE LOS REGISTROS

El responsable del laboratorio deberá disponer que una persona, no involucrada en la realización e informe del cultivo, verifique un día por semana al azar que los datos y resultados consignados en los informes elaborados ese día coincidan exactamente con los registrados en el Libro del Laboratorio Esto puede ser realizado por el responsable del laboratorio en el caso en que él mismo no procese e informe muestras.

El responsable del laboratorio deberá controlar al menos una vez por mes

- que las muestras recibidas para investigación diagnóstica sean distinguidas de las recibidas para

control de tratamiento. Esto permite interpretar los resultados, orientar la secuencia de estudios bacteriológicos necesarios para cada paciente y mantener un seguimiento de los resultados bacteriológicos como método de control de calidad interno. Introducir medidas correctivas tomando contacto con las personas que reciben y envían las muestras, en el caso en que la información sea deficiente

- que se procesen muestras todos los días establecidos en la rutina de trabajo, que no se detecten demoras mayores a los 3 días de tomadas las muestras, y no mayores a las 4 horas de tomadas las muestras de lavados gástricos
- la confección de una ficha individual para cada paciente que tenga resultado positivo conteniendo todos los resultados bacteriológicos obtenidos con muestras de ese paciente Puede mantenerse en una base de datos en computadora. Esto permite seguir la evolución bacteriológica del paciente, desencadenar estudios adicionales en el caso en que sean requeridos y detectar posibles inconsistencias cuyas causas deben ser investigadas
- que se hayan pedido nuevas muestras en el caso en que las recibidas hayan resultado irrecuperables
- que hayan sido derivados para identificación y prueba de sensibilidad los aislamientos de los pacientes que lo requieran, de acuerdo a lo detallado en este Manual

SEGUIMIENTO DE LOS RESULTADOS

Diario

El responsable del laboratorio deberá detectar las siguientes señales de alarma

Muestra con baciloscopia positiva y con cultivo negativo

Investigar

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

Muestra contaminada

Investigar

- si transcurrió un tiempo excesivo entre el momento de la toma y el procesamiento, caso en el cual se reorganizará el transporte de muestras o se corregirá la rutina de trabajo del laboratorio según corresponda.
- si se repite la contaminación en muestras del mismo paciente, se procederá a utilizar técnicas más enérgicas de decontaminación para investigar muestras sucesivas de ese individuo.
- si se repite contaminación de muestras derivadas por un mismo servicio, se procederá a coordinar los envíos más oportunos y en condiciones apropiadas

Contaminaciones sistemáticas

(varias en un día, todas las muestras decontaminadas, etc).

Se verificará la esterilidad de los reactivos y el proceso de decontaminación y se harán las correcciones técnicas en caso de detectarse desvíos de la norma.

Se reorganizará el transporte y rutina de trabajo del laboratorio en caso en que la demora en el procesamiento desde la toma de la muestra sea excesiva. Se re-entrenará al técnico o profesional que haya procesado las muestras contaminadas en caso en que se detecte que el problema se asocia a un operador.

Incremento inusual del número o frecuencia de cultivos positivos en un corto periodo de tiempo

(con muestras de pacientes que no tienen conexión epidemiológica, es decir no integran un grupo conviviente, por ejemplo)

Se deberá investigar la posibilidad de que haya existido contaminación cruzada y por lo tanto falsos resultados positivos de cultivo. Se verificará si

- los pacientes involucrados no tienen clínica compatible con tuberculosis
- no se repite el aislamiento a partir de otra muestra de estos pacientes
- una o varias muestras involucradas en el episodio resultaron con un cultivo con escasas colonias y fueron procesadas inmediatamente después de una muestra con alta carga de bacilos (baciloscopia positiva)

Estos hallazgos sustentan la sospecha de que existió transferencia de bacilos de la muestra con alta carga bacilar a las otras que resultaron con escaso número de colonias. Si, además, se constata que resultaron positivos sólo los cultivos de muestras que han sido decontaminadas, se sospecha que la transferencia fue realizada mediante las soluciones o instrumentos utilizados durante el proceso de decontaminación.

En caso de demostrar, o no poder descartar, contaminación cruzada verificar si

- se están alicuotando y descartando remanentes de los reactivos utilizados en el procesamiento de muestras
- se mantienen los cuidados al dispensar soluciones dentro de los tubos
- se mantiene el orden recomendado para el procesamiento de muestras (procesando al final las muestras con baciloscopia positiva)
- no se abren tubos en serie simultáneamente
- no se abren tubos inmediatamente después de retirados de la centrífuga
- si se descartan con suavidad y precaución los sobrenadantes

Informe de cultivo positivo, sin mayor aclaración, cuando se han aislado colonias con características no compatibles con M. tuberculosis

El informe debe ser claro en descartar la presencia del bacilo de la tuberculosis cuando el cultivo de BAAR presenta colonias cromógenas. Se debe verificar que se hayan identificado los cultivos que, excepcionalmente, presenten características no compatibles con *M. tuberculosis* y que sean no cromógenos. Para este control es necesario contar con un registro de laboratorio en el que se hayan consignado las características morfológicas, pigmentación y velocidad de desarrollo de los aislamientos.

Periódico

Dependiendo de la carga de trabajo y de la incidencia de casos con bacteriología positiva, el análisis mensual, trimestral o semestral del registro del laboratorio permite detectar errores sistemáticos y sostenidos en el tiempo.

Resulta de interés para controlar la calidad del cultivo, clasificar a los pacientes adultos que se hayan diagnosticado con tuberculosis pulmonar confirmada bacteriológicamente, en alguna de las siguientes categorías:

a. - Baciloscopia (+) y cultivo (+)
b. - Baciloscopia (+) y cultivo no realizado
c. - Baciloscopia (-) y cultivo (+)
d. - Baciloscopia (+) y cultivo (-)
e. - Baciloscopia (+) y cultivo contaminado
f. - Baciloscopia no realizada y cultivo (+)

Con el total de **casos** clasificados en cada una de estas categorías, se podrán calcular los siguientes indicadores

Aporte del cultivo al diagnóstico =

$$\frac{c}{a + b + c + d + e} \times 100$$

El cultivo es más sensible que la baciloscopia, se espera que su aporte al diagnóstico de las formas pulmonares del adulto sea por lo menos de un 20% de los casos con confirmación bacteriológica.

Relación entre resultados de baciloscopias y cultivos

Las **muestras investigadas para diagnóstico** con resultado de baciloscopia positivo deben tener normalmente resultado de cultivo positivo. El grado de positivi-

dad del cultivo (en escala de cruces) debe normalmente ser igual o mayor al de la baciloscopia (también en escala de cruces). Más de un 3%, de muestras cuyo resultado de cultivo tenga un grado de positividad menor al de la baciloscopia es motivo de investigación.

Analizando el resultado de las muestras de esputo investigadas para diagnóstico se puede calcular

Porcentaje de muestras baciloscopia (+) cultivo (-) =

$$\frac{d}{a+b+c+d+e} \times 100$$

Esta proporción debería ser muy baja; alrededor del 2-3%, de otra forma de impone la necesidad de investigar fallas técnicas. Excepcionalmente se encuentran enfermos cuyas baciloscopias de diagnóstico son sistemáticamente positivas y sus cultivos negativos. En general, se trata de muestras de un paciente de quien se desconoce que esta bajo control de tratamiento

Contaminación

Expresada como porcentaje de **tubos** contaminados sobre el total de tubos sembrados, no debe superar el 3- 4 % si se utiliza el método de Petroff. Cuando se emplea una concentración menor de hidróxido de sodio y medios de cultivo más ricos (como lo propuesto para los sistemas de lectura automatizada o MGIT), este porcentaje puede llegar a 8 -9%.

	Valor normal (%)	**Señales de alarma**	
		Si es mucho mayor investigar	Si es mucho menor investigar
Aporte del cultivo al diagnóstico bacteriológico de tuberculosis	**20**	A	B y C
Porcentaje muestras B+C-	**2-3**	C y D	No hay problema
Porcentaje de cultivos con positividad menor a la de la baciloscopia	**3**	C y E	No hay problema
Porcentaje de tubos contaminados	**3-4**	F	G

A	• errores de lectura de baciloscopias: "falsos negativos" • se está investigando un alto porcentaje de casos de tuberculosis pulmonar poco avanzada, incluyendo pediátricos (no indica problema técnico de laboratorio)
B	deficiente solicitud de cultivos (se están investigando pacientes que no son SR)
C	• excesiva demora entre la toma y procesamiento de las muestras • decontaminación muy enérgica de las muestras (excesiva concentración y/o tiempo de contacto con el decontaminante) • baja velocidad o sobrecalentamiento en la centrífuga • baja sensibilidad de los medios (falta de homogeneidad, sobrecalentamiento al coagular, exceso de verde de malaquita, pH excesivamente ácido) • incubación a temperaturas muy altas u oscilantes
D	• errores de lectura de baciloscopias: "falsos positivos"
E	• tendencia a asignar a la baciloscopia una positividad mayor a la real
F	• muestras conservadas sin refrigeración • demora entre la toma y procesamiento de las muestras • concentración de decontaminante más baja que lo normalizado • escaso tiempo de contacto de la muestra con el decontaminante; • defectos en el proceso de esterilización • descuidos en procedimientos que requieren esterilidad (mal uso de mechero y/o de la cabina de seguridad biológica, excesivo movimiento de gente en el área de trabajo, generación de corrientes de aire por ventiladores o equipo de aire acondicionado, etc.)
G	• concentración de decontaminante más alta que lo normalizado • excesivo tiempo de exposición de la muestra con el decontaminante • concentración de verde de malaquita en el medio más alta que lo normalizado

SR: sintomático respiratorio

ANÁLISIS DE LA DEMORA EN LA ENTREGA DE INFORMES

Más del 95% de los resultados deben haber sido entregados dentro de los 63 días de tomada la muestra cuando se utiliza el método de cultivo convencional, y dentro de los 30 días cuando se utiliza equipo de lectura automatizada. Verificar que un porcentaje similar de los cultivos positivos hayan sido informados dentro de las 48 horas de detectado el desarrollo.

Es necesario confirmar además que los resultados sean recibidos, en el servicio en el que el paciente entregó su muestra o en el consultorio del médico que solicitó el estudio, en el menor tiempo posible, por más alejado que esté, estimulando el uso de fax, correo electrónico, etc, toda vez que estén disponibles.

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

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

En países con una red de laboratorios establecida y organizada en la que algunos laboratorios de nivel intermedio también realizan cultivo, el laboratorio de referencia nacional centraliza el control de calidad de los medios elaborados en esa red y analiza el aporte del cultivo al diagnóstico de tuberculosis. La responsabilidad de la organización de la experiencia y la recolección de la información pueden ser descentralizadas hacia el nivel de referencia regional si así es requerido por el grado de desarrollo de la red de laboratorios

El director del laboratorio es responsable de establecer y analizar los resultados del control de calidad interno y de realizar las correcciones necesarias cuando se detectan deficiencias

Es crítico asegurar la calidad de los registros de

- ingreso y procesamiento de muestras y de derivaciones al laboratorio de referencia
- resultados bacteriológicos
- resultados de evaluación de la calidad medios de cultivo y reactivos
- temperatura de los equipos

Mediante el análisis de la información registrada, es necesario evaluar

- la organización y agilidad del trabajo
- resultados falso positivos o negativos, contaminación
- rendimiento del cultivo para el diagnóstico de casos de tuberculosis
- precisión, claridad y agilidad para el informe de resultados

La evidencia de desorganización, errores o falta de adherencia a las normas técnicas o demoras evitables debe desencadenar la investigación de las causas y la programación e implementación de las medidas correctivas pertinentes (reuniones de discusión con el personal involucrado del laboratorio o relacionado con el laboratorio, re-organización de las tareas, re-entrenamiento, reemplazo de reactivos, etc)

BIBLIOGRAFÍA SELECCIONADA

Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, GA, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Diseases Prevention and Control, 1985.

Kudoh S, Kudoh T. A simple technique for culturing tubercle bacilli. Bull WHO, 51: 71,1974

Orozco LC, Franco CI, Giraldo de Blanco E, Quintero de Ramos O, Ulloa de Moreno AI. El cultivo de esputo para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. Comparación del método de Petroff en Löwenstein Jensen y la técnica del escobillón en medio de Ogawa, modificado por Kudoh. Biomédica 5: 24-25.1985

Organización Mundial de la Salud. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Ginebra 2005

Organización Mundial de la Salud/Organización Panamericana de la Salud. Bacteriología de la tuberculosis. El cultivo. Nota Técnica N°27/Rev1. Argentina, 1988.

Organización Mundial de la Salud. Servicios de Laboratorio en el Control de la Tuberculosis. Parte III: Cultivo. WHO/TB/98.258

Recommendations on the transport of dangerous goods. Mode regulations (fourteenth revised edition).New York, United Nations, 2005 (ST/SG/AC.10/1/Rev.14)

Robledo JA, Mejia GI, Chacon L, Camacho M, Luna J, Zurita J, Bodon A, Velasco M, Palomino JC, Martin Q, Portaels F. Evaluation of a rapid culture method for tuberculosis diagnosis: a Latin American multi-center study. Int J Tuberc Lung Dis, 10: 613-619. 2006

Sequeira MD, Latini O, López B, Símboli N, Barrera L. Garantía de Calidad de los Métodos bacteriológicos aplicados al Diagnóstico y control del Tratamiento de Tuberculosis. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" INER E. Coni./ INEI. DOC. TEC. INER. DyR. N° 10/03. Argentina 2003.

Susemihi MAA de MM, Ferrrazolli L, Ueki SYM, Jiménez RD, Palaci M Avaliação do método do Ogawa-Kudoh para o cultivo de micobacterias. Rev Bras Pat Clin: 29:51-54. 1993

ANEXO I
MEDIDAS MÍNIMAS DE BIOSEGURIDAD

Ningún elemento de protección es tan necesario como la información, la organización en el trabajo, la concentración, el estado de alerta, y la precaución.

Básicamente es necesario evitar la generación y movimiento de aerosoles que son el vehículo más peligroso para transmitir y transferir bacilos.

Ningún equipo, por costoso que sea, puede brindar protección cuando el personal del laboratorio no adopta y mantiene prácticas seguras.

Se recomienda revisar todas las recomendaciones presentadas en el **Anexo I** de la primera parte de este Manual para laboratorios que realizan baciloscopia bajo los títulos de

Información y control medico del personal de laboratorio
Precauciones generales de trabajo
Precauciones en la toma y manipulación de las muestras
Manipulación y uso de desinfectantes
Manipulación de otras sustancias químicas
Procedimientos frente a un accidente de trabajo

Son básicas y deben ser respetadas en los laboratorios de todos los niveles.

Para laboratorios que realizan cultivo se agregan las siguientes recomendaciones

ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL

- El personal que procese que trabaje en el laboratorio de procesamiento de muestras para el cultivo debe estar informado y entrenado en
  - riesgos, forma de transmisión de la tuberculosis
  - higiene
  - uso adecuado de la ropa de protección
  - manejo de material (potencialmente) infeccioso
  - forma de operar para evitar la formación de aerosoles
  - diseño del laboratorio, flujo de material y del aire
  - operaciones a realizar en el caso de accidentes
  - operación y mantenimiento de los equipos de laboratorio
  - buenas practicas de laboratorio
- Debe haber demostrado competencia en prácticas microbiológicas con el bacilo de la tuberculosis. Especialmente, debe haber demostrado habilidad para operar propipetas. El

entrenamiento puede lograrse practicando el dispensado de agua, en condiciones de esterilidad, dentro de tubos, hasta lograr operar con serenidad, movimientos suaves y seguros, sin tocar tubos o paredes de los tubos, sin perder líquido por goteo, sin salpicar y midiendo con precisión determinados volúmenes

EL LABORATORIO DE CULTIVO DE MUESTRAS

- Señalizar el laboratorio con un cartel que indique riesgo biológico y acceso restringido a personal entrenado y autorizado, e identifique y permita ubicar al responsable del laboratorio
- Mantener las puertas cerradas
- No permitir el acceso de personal de limpieza o mantenimiento si no están bajo supervisión del personal de laboratorio entrenado, o si no es personal entrenado especialmente y debidamente autorizado
- Eliminar roedores o artrópodos que pueden ser vehículos de bacilos mediante la desinfectación periódica con productos activos contra estos animales.
- Guardar los elementos que no estén en uso, mantener ordenado el material y equipo necesarios en el laboratorio
- Asignar a cada empleado la responsabilidad de mantener el orden, limpieza y desinfección del área donde ha trabajado y de áreas de uso común.
- Verificar que el aire y el material (potencialmente) infeccioso se desplacen en una única dirección desde áreas de trabajo de menor riesgo a las de mayor riesgo.

INDUMENTARIA Y EQUIPO DE PROTECCIÓN DEL PERSONAL

- No utilizar anillos ni ningún tipo de joya o *bijouterie*, incluyendo el reloj, mientras se trabaje en el laboratorio
- Utilizar ambos (equipo de pantalones o faldas y blusón) para promover el reemplazo de la ropa de calle durante las horas de trabajo y para brindar mayor protección contra posibles salpicaduras.
- No utilizar la ropa de trabajo fuera del laboratorio. Si es reutilizable, decontaminarla antes de lavarla
- No guardar la ropa de trabajo junto con la ropa de calle. Finalizada la tarea, es conveniente dejar los guardapolvos/batas o ambos bajo una luz UV.
- Tener disponibles a la vista de todo el personal mascarillas/barbijos/cubrebocas tipo N95 o mejor aun N99.

OPERACIONES DENTRO DE UNA CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

- Mantener un plan regular de verificación y documentación del buen funcionamiento de la cabina. No utilizarla si no funciona correctamente.
- Evitar la circulación de personas cerca de la cabina mientras se trabaja.
- Encender el equipo al menos 5 minutos antes de comenzar la tarea para permitir que se establezcan los flujos laminares de aire.
- Ubicar dentro de la cabina sólo el material necesario y en su totalidad, antes de comenzar a trabajar. Es conveniente tener escrita una lista de los materiales necesarios para verificar que nada falte. No introducir en la cabina formularios, ni libros, ni registros.
- Para absorber posibles salpicaduras, es conveniente cubrir el área de trabajo con una toalla de papel que será doblada y descartada dentro de un recipiente o bolsa autoclavable al finalizar el trabajo
- No bloquear con el material ninguna de las grillas/rejillas por las que circula el aire dentro de la cabina.
- No utilizar llama dentro de la cabina porque altera el flujo de aire y afecta la duración e integridad de los filtros.
- Esperar un minuto luego de introducir las manos para comenzar a operar, de manera que se re-establezca el flujo laminar perturbado en estas operaciones.
- Operar en la zona media de la cabina.
- No dejar destapados los tubos o frascos o botellas con los que se está operando. Cerrarlos inmediatamente después de haber sacado o transferido material dentro de ellos.
- No retirar el material de la cabina hasta que se haya

terminado de operar, para evitar perturbar nuevamente el flujo de aire.

- No subir ni abrir la ventana de la cabina mientras se está trabajando
- Si por accidente se derrama material (potencialmente) infeccioso, mantener la cabina funcionando cubrir la superficie afectada con una toalla de papel embebida en solución de fenol al 5%, dejar actuar durante 30 minutos y descartar con pinzas todo el material dentro de un recipiente o bolsa autoclavable. Si se ha salpicado la rejilla, quitarla y limpiar con fenol al 5% el piso que está debajo
- Si suena la alarma, cerrar de inmediato todo frasco o tubo con material infeccioso, decontaminar la superficie de trabajo, apagar el equipo, quitarse y descartar para su autoclavado los guantes en uso. Dejar de operar en la cabina hasta que esté reparada.
- Al finalizar la tarea dejar el equipo funcionando durante 5 minutos para purgar el aire contaminado. Decontaminar la superficie de trabajo paredes laterales y la ventana con etanol al 70-80% ; enjuagar luego con agua destilada. El cloro puede ser corrosivo para el metal. Encender el tubo UV
- Antes de la verificación técnica de la cabina, y más aún si es necesario un cambio de filtros, y toda vez que sea necesario trasladarla, decontaminar la cabina. El proceso requiere la inhabilitación del área de trabajo durante un día por lo que conviene programarlo durante un fin de semana. Puede aplicarse el siguiente protocolo que simplifica y generaliza los cálculos necesarios
  - Calcular el volumen total de la cabina en metros cúbicos multiplicando las medidas externas de la cabina (alto en metros x ancho en metros x profundidad en metros)
  - Calcular la cantidad de formalina a usar multiplicando el volumen de la cabina por 11,1g. Muy exageradas cantidades de formalina pueden resultar EXPLOSIVAS o causar que el formaldehído polimerice sobre las superficies.
  - Manipular la formalina con guantes, y en el momento de generar gas formaldehído es necesario utilizar protector de ojos y máscara de protección para gases.
  - Pesar la cantidad de formalina calculada y colocarla en un recipiente de vidrio tipo *Pyrex* o metálico.
  - Tapar el ducto de salida del filtro exhaustor. Si no tiene tapa, sellarlo con un film o bolsa plástica y cinta adhesiva. Asegurar el buen cierre del vidrio protector, tener a mano cinta adhesiva para sellar cualquier abertura, de manera que no se produzca fuga de gas formaldehído.
  - Colocar agua destilada en un recipiente, calentarla a punto de ebullición
  - Introducir el recipiente con agua en la cabina sobre un trípode, y con un calentador por debajo
  - Cerrar la ventana de la cabina y calentar hasta que el vapor condense en las paredes internas.
  - Subir el vidrio protector, retirar el recipiente con agua, introducir el recipiente con la formalina pesada, cerrar completamente la cabina bajando el vidrio protector.
  - Calentar la formalina durante 10 minutos.
  - Poner en funcionamiento la cabina y dejar funcionando durante 30 segundos para hacer circular el gas. Apagar la cabina.
  - Continuar el calentamiento durante otros 10 minutos. Volver a encender el equipo por 30 segundos más.
  - Apagar la cabina y el calentador. Cerrar bien la ventana. Dejar la cabina en reposo al menos 6 horas, puede convenir que sea durante toda la noche.
  - Para neutralizar el formaldehído, colocar dentro de la cabina bicarbonato amónico en cantidad 10% superior a la formalina, encender el calentador y dejar que se evapore totalmente. Encender la cabina durante dos intervalos de dos segundos para que circule el bicarbonato. Dejar en reposo 30 minutos.
  - Destapar el ducto de salida (exhaustor), subir la ventana de vidrio de la cabina y ponerla en funcionamiento. Retirarse del laboratorio y dejar funcionar el equipo al menos 1 hora. Ventilar al mismo tiempo completamente el laboratorio si la cabina no tiene ducto que expulse el aire directamente hacia el exterior
  - Limpiar las superficies del equipo con un paño

húmedo en agua
— Cuando se cambien los filtros, verificar que el personal que lo haga utilice ropa y guantes de protección, coloque los filtros a descartar dentro de una bolsa impermeable y con cierre hermético para su incineración u otro tratamiento decontaminante aceptado por las normas vigentes en el pais.

PRECAUCIONES GENERALES PARA EL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- Lavarse frecuentemente las manos
- Utilizar guantes desechables para manipular material (potencialmente) infeccioso. Tener presente que las muestras pueden contener otros microorganismos además del bacilo de la tuberculosis, incluyendo el virus de hepatitis B HIV. Quitárselos inmediatamente al terminar el trabajo. No tocar con ellos puertas, teléfonos, llaves lavamanos etc)
- Utilizar propipetas, pipetas y asas con las características descritas en este Manual.
- Reemplazar material de vidrio por material de plástico toda vez que sea posible. En especial utilizar tubos de plástico para centrifugar.
- Revisar los tubos antes de utilizarlos. Descartar los que parezcan dañados o defectuosos.
- Nunca pipetear con la boca en el laboratorio, ni siquiera cuando se opera con soluciones estériles.
- Mezclar suspensiones y soluciones dentro de un tubo cerrado, por agitación manual o mecánica, nunca pipeteando.
- No expulsar con fuerza el líquido de una pipeta.
- Descartar las pipetas en un reciente con tapa conteniendo hipoclorito de sodio al 1%, ubicado dentro de la cabina, hasta el momento en que sean autoclavadas dentro de ese recipiente.
- Tapar cada uno de los tubos de ensayo inmediatamente después de utilizarlo, y antes de descartarlo en el recipiente donde serán autoclavados
- Decontaminar con hipoclorito de sodio 1% el exterior de los recipientes conteniendo soluciones estériles, las superficies de trabajo, el rotor y los cestillos contenedores de tubos de la centrífuga al finalizar la tarea.

CENTRIFUGACIÓN

- Procurar una centrifuga segura, como la descrita en este Manual, y tubos de plástico desechables. Si no es posible obtenerlos, optar por un método que prescinda de la centrifugación
- Asegurar rigurosamente el equilibrio de los tubos colocados en forma opuesta dentro del rotor de la centrifuga. Es conveniente utilizar un tubo con igual volumen de etanol 70% para equilibrar cada tubo que contiene una muestra. Utilizar tubos del mismo tipo y grosor.
- Respetar los límites de carga y velocidad de la centrifuga establecidas por el fabricante.
- Nunca abrir la centrifuga mientras está en funcionamiento.
- Abrir los contenedores de tubos de la centrifuga dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Dejar reposar los tubos al menos 5 minutos después de agitarlos con la mano, con *vortex,* o después de centrifugarlos, antes de abrirlos.
- Eliminar muy cuidadosamente los sobrenadantes, con una maniobra suave evitando salpicaduras, en un recipiente con tapa que contenga hipoclorito de sodio al 1% que pueda ser cerrado inmediatamente después de utilizado, y luego autoclavado

PROCESAMIENTO Y DESECHO DE MATERIAL CONTAMINADO

Deben respetarse las normativas vigentes en el país para el desecho de material biológico patógeno. Mínimamente deberán observarse las siguientes precauciones

- Descartar y transportar el material (potencialmente) infeccioso en contenedores seguros, cerrados y que resistan el autoclavado, de acero inoxidable o plástico polipropileno. Pueden ser utilizadas bolsas autoclavables para separar distintos tipos de material dentro de ellos. Siempre deben utilizarse estas bolsas para descartar material de plástico que se

funde con el calor durante el autoclavado

- Mientras se realizan los procedimientos del laboratorio separar en contenedores distintos el material
  - que será desechado
  - que será reciclado
  - cortante o punzante

  Colocar el material cortante o punzante en recipientes a prueba de perforación y que puedan ser autoclavados, sin extraer el material.
- No utilizar contenedores muy grandes, no compactar el material dentro de ellos ni llenarlos sino hasta sus dos terceras partes, para permitir que el vapor del autoclave penetre adecuadamente
- No descartar material que no este previamente autoclavado Autoclavar diariamente el material a desechar y reciclar, luego de finalizada la tarea. No dejar acumular el material de varios días.
- Controlar la efectividad del proceso de esterilización. Se comercializan indicadores de distinto tipo, químicos y biológicos para este fin que viran de color cuando el proceso ha sido efectivo. Los controles biológicos requieren incubación de 24 a 48 hs.
- Reemplazar los burletes de la tapa del autoclave que estén deteriorados, para asegurar el cierre hermético y evitar el escape del vapor del agua. Mantener la limpieza de la cámara de la autoclave y de las válvulas de escape
- Disponer los recipientes en forma no compacta dentro del autoclave, para permitir el acceso del calor en forma homogénea
- Autoclavar el material contaminado durante una hora a partir del momento en que se haya alcanzado los 121 °C y se haya purgado el aire del autoclave a través de su válvula. Resulta práctico uniformar los tiempos de esterilización en una hora, aunque en muchos casos la esterilización se alcanza en menos tiempo, dependiendo del volumen del material colocado, de la consistencia del contenido de los envases (liquido o sólido), de la forma en que se ha ubicado dentro del autoclave, de la carga y tipo de gérmenes que tenga y de la altitud a la que se esté trabajando.

  Se logra esta presión calentando el agua que se coloca en el interior del autoclave hasta ebullición y permitiendo que se sature toda la cámara con vapor. Se debe remover todo el aire del interior del autoclave a través de su válvula, para que quede totalmente saturada con vapor de agua, de lo contrario la temperatura que se alcanza a la misma presión es menor.
- Permitir que el autoclave enfríe antes de abrirlo para evitar quemaduras con vapor y líquidos muy calientes.

UTILIZACIÓN DE TUBOS QUE EMITEN LUZ UV

Su empleo es optativo, son útiles para complementar la acción de los desinfectantes sobre superficies de trabajo, instrumentos utilizados, ropa de trabajo, pero no como elemento único de decontaminación.

- Ubicarlos a no más de 40 cm de distancia de la superficie a tratar.
- Encenderlos después de completado el trabajo, y al retirarse del laboratorio. No permanecer en el laboratorio con los tubos UV encendidos, pueden dañar los ojos y desencadenar cáncer de piel. Las cabinas de seguridad biológica tienen por lo general cristales protectores contra UV.
- Irradiar durante 1 a 2 horas
- Limpiar el tubo UV cada semana con etanol al 70-80%, la intensidad es afectada drásticamente por la acumulación de polvo y suciedad.
- Reemplazar el tubo periódicamente, es activo durante 7000 a 9000 horas de uso, dependiendo del tipo.

MANTENIMIENTO DE LA HIGIENE DE REFRIGERADORES Y ESTUFAS DE CULTIVO

- Limpiar y desinfectar periódicamente con solución de hipoclorito 1% los estantes, paredes y recipientes de refrigeradores y estufas utilizados para mantener muestras de pacientes o cultivos positivos. El personal de laboratorio entrenado debe hacerse cargo de esta tarea utilizando guantes.
- Autoclavar y desechar el material no identificado.

PLAN DE CONTINGENCIA PARA ACCIDENTES DE TRABAJO

Los accidentes mas graves son los que involucra la rotura de tubos o botellas con cultivos positivos, por el alto numero de bacilos que contienen

- Poner visible en el laboratorio el nombre y teléfono de un médico con experiencia en el tratamiento de tuberculosis al que se pueda recurrir en caso de accidente grave
- Autoclavar los cestos contenedores de tubos de la centrífuga cerrados si se sospecha o se comprueba alguna rotura dentro.
- Si se rompe material (potencialmente) infeccioso fuera de la cabina de seguridad, fuera de rotores o recipientes cerrados autoclavables, de inmediato hacer retirar el personal del área, ponerse barbijos N95 o N99, si no están siendo utilizados, rociar el área afectada con fenol al 5%, cubrir con papel y rociar nuevamente con fenol al 5%. Retirarse del área, dejar actuar el desinfectante durante 30 minutos, recoger luego con guantes y una pinza el material roto dentro de un recipiente autoclavable conteniendo fenol 5%. Volver a desinfectar la superficie afectada con fenol al 5% y ventilar el laboratorio antes de retomar las tareas.
- Registrar cada accidente haciendo constar la fecha, el nombre de la(s) persona(s) involucrada(s) y el número que identifica la(s) muestra(s) o el/los aislamiento(s) que estaba manipulando. El resultado del cultivo y eventualmente de la prueba de sensibilidad correspondiente a este material permitirá orientar la quimioprofilaxis del laboratorista accidentado, en el caso en que el médico que lo asiste decida administrarla.

PRECAUCIONES PARA LA DERIVACIÓN DE CULTIVOS POSITIVOS A OTRO LABORATORIO

Los cultivos positivos contienen muy alto número de bacilos vivos patógenos y por lo tanto su transporte genera muy alto riesgo, mucho mayor que el inherente al transporte de muestras. El riesgo se complica cuando se movilizan cultivos de bacilos que son resistentes a las drogas. Sin embargo es posible hacerlo en forma segura si se toman todas las precauciones para no exponer a las personas que los transporten (personal de salud, de las empresas de correo o transporte) y a quienes los reciban. Se deben respetar la reglamentación internacional y nacional vigente. El Programa de Control de Tuberculosis y el Nivel de Referencia Nacional de la red de laboratorios deben procurar lo necesario y establecer una organización que permita que los cultivos puedan ser transportados con bioseguridad y, a la vez, en forma rápida y sin impedimentos.

Cuando el envío es realizado por medio de empresas de transporte, está sujeto a normas y debe ser acondicionado dentro de envases y con etiquetas aprobados por la autoridad competente El traslado en mano de este tipo de material esta prohibido por las empresas de transporte internacional. El remitente es responsable del envío.

En todo caso, las siguientes son los requisitos mínimos para el transporte seguro de cultivos positivos de *M. tuberculosis*

- Acondicionar los tubos a enviar con triple envase, de la siguiente forma
  - Asegurar el rótulo y el cierre hermético de la tapa del tubo que contiene el aislamiento (cultivo positivo), colocar una cinta adhesiva alrededor de la tapa. Es el primer envase.
  - Envolver cada tubo con material que amortigüe y pueda absorber todo el contenido del tubo en caso de accidente en tránsito, puede ser una capa de algodón de 2 cm. de espesor.
  - Colocar el tubo así protegido dentro de un segundo envase. Debe ser rígido, impermeable, con cierre hermético y resistente a golpes y presión de gran intensidad. Puede colocarse más de un tubo dentro del segundo envase asegurando que no haya contacto entre ellos
  - Colocar los formularios de solicitud de prueba de identificación/ sensibilidad dentro de una bolsa plástica.
  - Ubicar el segundo envase conteniendo el/los tubos y las solicitudes dentro de un tercer en-

vase. Puede ser de plástico, fibra corrugada, cartón duro, madera u otro material de alta resistencia.

Las normas internacionales requieren que este material resista una presión de 95 kPa (aproximadamente 1 kg cada cm^2)

La tercera caja debe estar identificada con una etiqueta bien visible y clara que tenga

- El rótulo "***Riesgo Biológico***"
- Una flecha que indique el sentido en el que debe mantenerse la posición de la caja para que los tubos queden en posición vertical con la boca hacia arriba
- Nombre de la institución y del responsable que realiza el envío, dirección, numero de teléfono/fax
- Nombre del profesional al que se envía el material, domicilio, número de teléfono (y Fax) del laboratorio de referencia.

- Entregar el material a personal entrenado para transportarlo y para actuar en caso de accidente
- Anunciar por teléfono al laboratorio de referencia el envío y comprobar que arribe según lo esperado

El personal del Laboratorio de Referencia desempaquetará los aislamientos en cabina de seguridad biológica y procederá a autoclavar todo el material recibido en el caso en que se hubiera producido algún accidente.

ANEXO II
EQUIPAMIENTO

En la primera parte de este manual se han descrito las características y cuidados de la balanza y el microscopio. Se describen aquí los equipos adicionales necesarios para la realización de cultivo

Varios de estos equipos son relativamente costosos. Seleccionar los que tengan buena referencia de otros usuarios y buena asistencia técnica local. Es muy conveniente contar con un compromiso firmado por el representante de la firma comercial que asegure asistencia técnica y comercial permanente y regular

Son preferibles los equipos simples, especialmente cuando no se cuenta con servicio de mantenimiento asegurado. Cuando existan dudas sobre las descripciones para la adquisición o para decidir entre varias opciones ofrecidas en el mercado local, o cuando no se conozca un proveedor local que ofrezca el equipo adecuado, es conveniente consultar a un laboratorio nacional o supranacional de referencia con experiencia en la compra y uso de los equipos.

AUTOCLAVE/ESTUFA DE ESTERILIZACIÓN

Es necesario un autoclave para esterilizar material contaminado y otro para el material limpio.

El material de vidrio limpio puede ser esterilizado por calor húmedo o seco si lo resiste. La estufa de esterilización, graduada a baja temperatura, puede ser utilizada también para secar el material limpio autoclavado.

En cambio el material contaminado es sometido a calor húmedo porque tiene mayor penetración en el material orgánico y esteriliza más rápidamente al bacilo de la tuberculosis y otros gérmenes. También se utiliza calor húmedo para esterilizar soluciones.

La temperatura de esterilización en una estufa con calor seco es de 170°C. Se debe permitir que la temperatura baje antes de sacar el material, de lo contrario el material de vidrio puede quebrarse y se pueden producir accidentes por quemaduras

El autoclave de vapor, tipo Chamberlain, es el equipo más versátil, de fácil manutención y muy prolongada vida útil para esterilizar con calor húmedo. Se trabaja a 121°C, temperatura que se alcanza con vapor de agua a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada o 1kg/cm^2 o 1 atmósfera. Se logra esta presión calentando el agua que se coloca en el interior del autoclave hasta ebullición y permitiendo que se sature toda la cámara con vapor. Se debe remover todo el aire del interior del autoclave a través de su válvula, para que quede totalmente saturada con vapor de agua, de lo contrario la temperatura que se alcanza a la misma presión es menor. El

tiempo de esterilización debe contarse luego de purgar el aire el autoclave.

HOMOGENEIZADOR O LICUADORA

Se utiliza para homogeneizar los huevos utilizados para preparar medios Esta operación puede ser realizada con un batidor manual de acero inoxidable. La licuadora permite hacerlo más rápida y eficientemente. Puede utilizarse una licuadora de uso doméstico siempre y cuando tenga recipiente y batidor autoclavables (por ejemplo de acero inoxidable) y el recipiente con suficiente capacidad (entre 2 a 4 litros).

BOMBA PERISTÁLTICA

No es indispensable. Agiliza y facilita mucho el trabajo de laboratorios proveedores de medios de cultivo para la red que preparan frecuentemente lotes de mucho volumen. Este tipo de bomba permite dosificar en forma manual y automática, con intervalos de tiempo variable, el volumen de medio que es dispensado dentro de cada tubo. Tienen un microprocesador que regula la velocidad y volumen de dispensado. Un sistema de bombeo permite tomar el medio del recipiente donde fue preparado y lo impulsa a través de una tubuladura de silicona, autoclavable, hasta descargarlo dentro del tubo.

El equipo también facilita el dispensado en serie de soluciones y reactivos dentro de tubos o frascos.

COAGULADOR

Se utiliza para solidificar los medios que contienen huevos coagulando su proteína mediante calor. La temperatura a la que se realice este proceso condiciona críticamente la calidad del medio. El equipo que se utilice para este proceso debe tener

- selector de temperatura.
- un termostato que mantenga la temperatura en el rango de 80-85 ° C, con una precisión de ± 1 °C o mayor.
- un sistema de baño de agua alrededor de cada estante o ventilación forzada que asegure temperatura uniforme en todo su interior.
- termómetro preciso, preferentemente con indicador externo que permita controlar la temperatura interior del equipo sin abrirlo.
- una cámara interior con capacidad adecuada para colocar los tubos inclinados, con una elevación de 5-10 ° C en el extremo superior, en numero suficiente para el volumen de medio que prepare el laboratorio

Existen coaguladores especialmente diseñados, actualmente construidos en acero inoxidable, con celdas inclinadas paralelas donde se ubican los tubos. Tienen patas graduables que permiten ajustar la inclinación del equipo y por ende graduar el “pico de flauta “ del medio. Las celdas están separadas por tabiques con pared doble conteniendo agua Son muy pocos los fabricantes de estos equipos.

Las estufas de incubación o secado modernas que tienen doble puerta, una de vidrio interna y otra externa, con termostato preciso y un sistema de circulación interna del calor, son una buena alternativa. Sobre sus estantes se pueden colocar bandejas con una varilla de vidrio, u otro soporte adecuado, sobre la que se apoyan los tubos inclinados. En el momento de la adquisición es conveniente solicitar al fabricante que coloque todos los estantes posibles a una distancia de 25-50 cm. Los estantes, bandejas y soportes deben ser de un material buen transmisor de calor para asegurar la coagulación uniforme, por ejemplo de alambre trenzado o metal perforado.

Dado que la temperatura es critica para la calidad de los medios, es necesario mantener un registro de la temperatura que alcanza interiormente el equipo durante cada ciclo de coagulacion

CENTRIFUGA

Las siguientes son las características requeridas

- firme, sólida, libre de vibraciones durante su funcionamiento.

- que alcance 3000 g manteniendo la temperatura por debajo de los 35 ° C (o que tenga sistema de refrigeración).
- rotor con tapa de cierre hermético para contener aerosoles
- rotor, tapa del rotor, contenedores de tubos y adaptadores autoclavables.
- contenedores de tubos con tapa
- la mayor capacidad posible para contener al menos tubos de 15 ml, y si es posible de 50 ml
- con una traba de seguridad para impedir la apertura de la centrifuga mientras está en funcionamiento.
- con detector de desbalance.

La revoluciones por minuto (RPM) son una medida de la velocidad a la que gira el rotor. La eficiencia que tiene la centrifuga para sedimentar depende de esa velocidad y también de la longitud del radio del rotor. A esta eficiencia se la llama fuerza de centrifugación (RCF son las siglas en inglés). Se mide en múltiplos de la fuerza de gravedad (g) Para sedimentar micobacterias con eficiencia aceptable se debe trabajar al menos a 3000 g.

Si se quiere calcular cual es la fuerza de centrifugación en g que se esta alcanzando al trabajar a determinada velocidad expresada en RPM, se aplica la siguiente fórmula

$$RCF = 1{,}12\ r\ (RPM\ /1000)^2$$

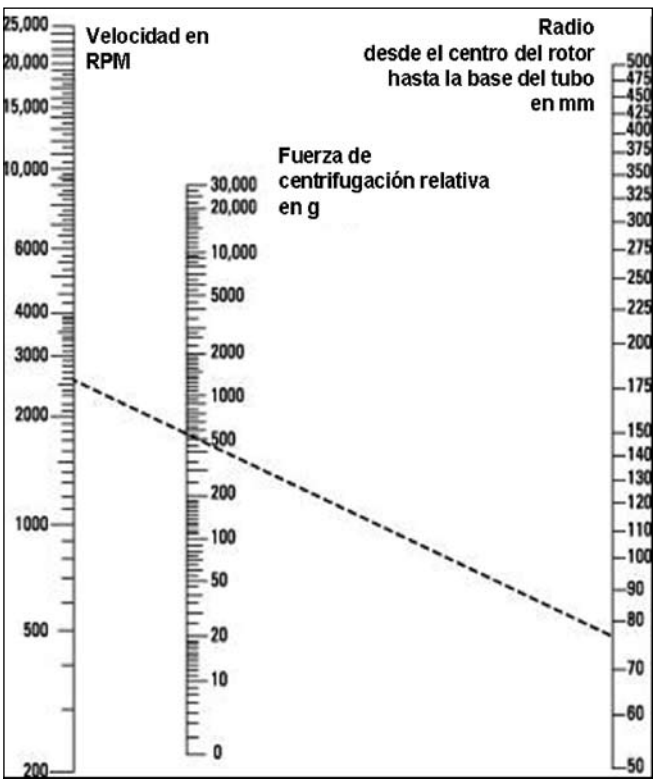
donde r es el radio (distancia entre el centro del rotor y la base del tubo)

Si se quiere calcular cuantas RPM se requieren para alcanzar una fuerza de 3000 g, se aplica la siguiente formula

$$RPM = 1000\ \sqrt{3000/1{,}12\ r}$$

Para hacer estas conversiones se puede utilizar un nomograma que relaciona las escalas de estas tres variables: RPM, radio y RFC. Uniendo con una línea los valores de dos de ellas, se obtiene el cálculo de la tercera en el punto de intersección de la línea trazada. A continuación se muestra un ejemplo.

Al centrifugar con un rotor que tiene un radio de 77 mm desde su centro hasta el punto donde esta la base del



tubo que se está utilizando, a una velocidad de 2600 RPM, se alcanza una fuerza de centrifugación de sólo 500 g

Existen centrífugas que permiten trabajar a 3000 g pero incrementando su temperatura significativamente por encima de los 37 °C. Esto resulta en un efecto letal para el bacilo, mayor cuanto más alta sea la temperatura que alcance

Muchas de la centrifugas en uso para el cultivo del bacilo de la tuberculosis no alcanzan la eficiencia adecuada, o calientan excesivamente las suspensiones, o son inseguras. En tal situación es necesario programar la renovación de las centrifugas de la red de laboratorios para procurar que el cultivo rinda adecuadamente

CABINA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

No son recomendables las cabinas que no estén fabricadas por empresas certificadas, que aseguren sólida construcción del equipo, perfecto sellado de junturas,

y alta eficiencia en la circulación y filtrado del aire. Cabinas ineficientes pueden concentrar los aerosoles, permitir que filtren hacia el ambiente, y aun impulsarlos sobre el operador lo que, lejos de brindar seguridad, aumenta el riesgo.

Las cabinas que crean flujo laminar sólo para mantener estéril el área de trabajo, no son de seguridad biológica y no deben ser utilizadas como tales.

Pueden utilizarse cabinas de clase I o II. Las de clase I toman el aire del medio ambiente, lo impulsan, sin esterilizar, dentro de la cabina hacia el área de trabajo, de allí lo extraen, lo esterilizan por filtración, y lo devuelven al medio ambiente Las de clase II son preferibles porque esterilizan el aire antes de impulsarlo dentro de la cabina, de manera que proveen atmósfera prácticamente libre de gérmenes al área de trabajo. En cabinas de clase II no son necesarios mecheros ni esterilizadores para operar, a menos que se utilicen asas metálicas. De hecho debe evitarse el uso de mecheros para aumentar la durabilidad de los filtros y evitar variaciones en el flujo de aire dentro de la cabina.

Para esterilizar el aire estos equipos tienen filtros de alta eficiencia HEPA que retienen partículas de 0,3 µm o mayores, con una eficiencia de 99,99%, de esta manera atrapan microorganismos y esporas, además de las partículas ambientales

El sistema de impulso de aire hacia el interior de la cabina crea una barrera, llamada flujo laminar, que protege al operador de los aerosoles que pueden crearse, cuando atraviesa con sus manos la barrera y procesa el material por detrás de ella. Los indicadores exteriores del equipo permiten controlar el caudal de aire. El operador mira a través de un cristal ubicado al frente de la cabina, enmarcado en una ventana móvil que debe estar baja mientras se opera con material de riesgo biológico.

La cabina puede tener un ducto flexible que conduzca fuera del edificio el aire estéril que se devuelve al medio ambiente y un sistema que impida su retorno. Según lo tenga o no las cabinas son clasificadas como tipo A o B respectivamente. Este ducto provee mayor seguridad para el caso en que se produzca algún accidente en el filtro exhaustor, contribuye a crear presión negativa dentro del laboratorio y resulta conveniente cuando es necesario desinfectar la cabina para expulsar hacia el exterior vapores tóxicos.

Las cabinas deben tener

- muy buena iluminación del área de trabajo; normalmente tienen también un tubo UV germicida, que no es indispensable pero si recomendable.
- nivel de ruido menor a 55dBA cuando está en funcionamiento para no exponer al personal del área.
- alarmas para evidenciar mal cierre de la ventana o alteraciones en el flujo laminar por cualquier desperfecto.

Es necesario el servicio técnico de personal capacitado para validar la instalación de la cabina y para verificar periódicamente su buen funcionamiento. La certificación es hecha en forma anual pero cuando comienzan a saturarse los filtros puede ser hecha por un periodo de seis meses. A medida que se saturan los filtros es posible aumentar el caudal del aire para vencer la mayor resistencia hasta el momento en que es necesario el cambio de filtros. Si se deja la cabina en funcionamiento cuando no se está trabajando en ella se contribuye a crear presión negativa del aire en un laboratorio pequeño, pero a la vez, como filtra polvo ambiental, se están consumiendo horas de vida útil de los filtros

Es conveniente tener siempre en reserva un juego de filtros, para que puedan ser reemplazados en el momento en que sea necesario sin interrumpir en forma prolongada la rutina de trabajo.

La verificación debe ser realizada de acuerdo a las normas nacionales e internacionales vigentes. Debe incluir pruebas de integridad de la cámara, fuga de los filtros HEPA, velocidad del flujo de aire descendente y en la abertura frontal, tasa de presión negativa y de buen funcionamiento de interruptores y alarmas. También pueden realizarse pruebas de intensidad de iluminación, luz ultravioleta, ruidos y vibraciones

El servicio técnico debe adherir a la vista en el equipo

el comprobante de la certificación y la fecha en la que debe repetirse la verificación, lo que dependerá del uso que tenga la cabina y del resultado de las mediciones.

INCINERADOR DE ASAS

Permite esterilizar, dentro de la cabina de seguridad biológica, las asas de alambre de *nicron*, puntas de pinzas y otros instrumentos metálicos delgados dentro de un tubo de vidrio o cerámica que es calentado a alta temperatura por un sistema eléctrico. De esta forma las partículas producidas al calentar el metal en el mechero quedan contenidas dentro del tubo hasta incinerarse. Se evita además el uso de llama dentro de la cabina que puede variar la dirección del flujo de aire por cambios de temperatura.

Conviene contar con un repuesto del tubo de reserva para el caso en que haya que reemplazarlo

AGITADOR DE TUBOS TIPO *VORTEX*

Es ubicado dentro de la cabina de seguridad biológica, y utilizado para lograr mejor homogenización durante el tratamiento de las muestras, sobre todo de esputo.

ESTUFA DE INCUBACIÓN

El cultivo del bacilo de la tuberculosis requiere un gran espacio para la incubación. Se debe tener en cuenta que los tubos deben permanecer en la estufa hasta dos meses y se van acumulando cada día de trabajo. Es conveniente contar con el modelo más grande posible que pueda ser ubicado dentro del laboratorio y cuyo costo pueda ser solventado. Los laboratorios de referencia pueden necesitar cuartos estufas.

Se deben tomar todas las precauciones para mantener la temperatura entre 35 y 37 °C uniforme y constante en toda la estufa. Las estufas de gran tamaño requieren circulación de aire forzado para mantener la uniformidad de la temperatura. Es necesario asegurar el buen funcionamiento del ventilador que distribuye el aire, cambiar los burletes de la puerta cuando han perdido integridad, no abrir la puerta innecesariamente durante la jornada de trabajo, principalmente cuando se trabaja en un cuarto estufa. Es conveniente que la estufa tenga doble termostato de manera que si falla uno funcione el segundo y se evite perdida de material cultivado. La estufa debe tener un termómetro exacto de temperatura mínima y máxima. Se debe tener expuesto cerca de su puerta el registro diario de la temperatura mínima y máxima.

La limpieza de la estufa debe ser mantenida por el personal entrenado del laboratorio.

BAÑO MARÍA O BLOQUE DE CALENTAMIENTO

Se requiere un baño maría pequeño o un bloque de calentamiento que asegure incubación a temperatura constante hasta 100 ºC, con una precisión de 0,1 ºC para realizar la prueba de catalasa a 68 ºC,

TERMÓMETROS

Son necesarios, en el rango de 0 a 100 ºC, con una precisión de 0,1 ºC, preferentemente calibrados. Son utilizados para controlar la temperatura en el interior de la estufa de incubación (son necesarios 4 para una cámara estufa), coagulador, refrigeradores y baño María o bloque de calentamiento. Son muy convenientes los termómetros que permiten introducir una sonda en el interior del equipo y pueden ser adheridos en el exterior para controlar la temperatura sin abrirlo, y los que marcan la temperatura máxima y mínima alcanzada por el equipo.

ANEXO III
MATERIAL DE VIDRIO, PLÁSTICO Y OTROS

PIPETAS

Son necesarias pipetas de 1 a 10 ml de vidrio o, si son accesibles, desechables de plástico, graduadas, estériles. Debe asegurarse que la boca de las pipetas encajen bien en la propipeta en uso

La boca de las pipetas deben tener algodón para evitar contaminar la propipeta. El algodón es introducido y empujado con un alambre hacia el interior del cuello de la pipeta, de manera que quede lo suficientemente compacto para permanecer firme durante el proceso de aspirado pero no demasiado compacto como para que lo dificulte.

No son recomendadas las pipetas tipo Pasteur porque generan riesgo de cortes en las manos.

Por el contrario son muy recomendables las pipetas de plástico con bulbo esteriles, graduadas, desechables, si son accesibles y el presupuesto permite incorporarlas en la rutina de trabajo. Son adecuadas para transferir muestras densas como las de esputo. Con ellas se prescinde de propipetas, se disminuye el trabajo de reciclado de material y se minimiza el riesgo de contaminación cruzada.

Las pipetas desechables también minimizan el riesgo de arrastrar restos orgánicos que eventualmente pueden ser inhibidores del desarrollo del bacilo.

DISPOSITIVOS PARA PIPETEAR

Eliminan el pipeteo con la boca y protegen del riesgo de ingestión/inhalación de gérmenes patógenos o químicos tóxicos en aerosoles o soluciones.

Los bulbos sin válvula son los más económicos y son adecuados. El bulbo con el que se succiona debe tener más capacidad que la pipeta más grande que va a ser utilizada, para operar con comodidad

Hay propipetas de bulbo con dos válvulas, una es presionada para cargar la pipeta y otra para descargarla. Permiten mayor control durante la medición del volumen y mayor seguridad porque no descargan el contenido a menos que se apriete la válvula correspondiente.

Conviene almacenarlas, antes de ser puestas en uso, dentro de sus bolsas plásticas y en refrigeración para evitar que se desequen y agrieten. Las propipetas agrietadas deben ser descartadas.

Las pipetas de bulbo protegidas con un pequeño filtro HEPA y las pipetas electrónicas son muy recomendables pero tienen mayor costo.

MORTEROS

Para desintegrar muestras de tejidos son necesarios morteros pequeños de porcelana u otro material liso, autoclavable. Son envueltos y esterilizados en papel o dentro de una bolsa autoclavable, con su mano o macerador dentro. Luego de utilizados y autoclavados deben ser limpiados con mucho esmero para desprender el material orgánico remanente

ASAS

Para evitar vibraciones y pérdida del material en el momento de transferirlo, el mango no debe ser más largo de 15 cm, el aro debe estar completamente cerrado y no debe tener más que 5 mm de diámetro.

Las de alambre están hechas, por lo general, de níquelcromo (*nicron*).

Las asas plásticas desechables con características similares, o las espátulas desechables, son siempre recomendables pero su adopción depende del presupuesto y de la disponibilidad de estos elementos en el mercado local

TUBOS O FRASCOS PARA ENVASAR LOS MEDIOS DE CULTIVO A BASE DE HUEVOS

Deben ser de vidrio resistente por bioseguridad.

Cuanto más grandes, mejor es el desarrollo del bacilo de la tuberculosis porque es posible ofrecer más superficie de medio, más oxigeno dentro del tubo o botella y es menos probable que se deseque el medio durante la incubación. Las botellas de McCartney de 14 o 28 ml son recomendables. También los tubos de 16 x 150 mm que permiten dispensar 6-7 ml de medio y los de 20 x 150 mm que aceptan 7-8 ml de medio.

No hay razón para preferir el tapón de algodón a la tapa de rosca. Las tapas de aluminio, bakelita o polipropileno autoclavables son aptas y ahorran mucho tiempo en la preparación del material. Es importante que las tapas tengan discos de teflón u otro material inerte y resistente al calor en su interior para evitar la desecación del medio.

TUBOS PARA CENTRIFUGAR

Si se están utilizando tubos de vidrio, es necesario iniciar un proceso de reemplazo por tubos desechables en pos de mejorar significativamente la bioseguridad. Se recomienda utilizar tubos desechables de 15 ml con tapa de rosca, graduados. Si el rotor de la centrifuga lo permite, es muy conveniente utilizar tubos de 50 ml para concentrar muestras con gran volumen (ej orina) y para hacer una única centrifugación durante el proceso de decontaminación en lugar de dos.

GRADILLAS, CESTOS Y BANDEJAS

Para trasladar e incubar tubos inoculados no es recomendable utilizar elementos de madera. No son higiénicos y no pueden ser decontaminados con eficacia. Si se trabaja con este tipo de material, conviene iniciar un proceso de reemplazo gradual por elementos autoclavables de acero inoxidable, o preferentemente de polipropileno.

Verificar que las cajas o cestos utilizados para incubar y trasladar tubos donde se han inoculado muestras tengan base resistente y que contengan el material dentro en caso de rotura por accidente

RECIPIENTES PARA AUTOCLAVAR MATERIAL

Deben ser inoxidables, con tapa que permita un cierre seguro aunque no hermético para que pueda autoclavarse adecuadamente su contenido, irrompibles, y resistir a alta temperatura. Pueden ser de acero inoxidable o polipropileno. La capacidad debe ser adecuada al volumen de material que se descarta cada día. Como mínimo, se requieren tres pipeteros, un recipiente para autoclavar el material para reciclar y otro para autoclavar el material a desechar. Los laboratorios con alta carga de trabajo deben tener dos o mas juegos de estos recipientes para asegurar el reciclado fluido del material

ANEXO IV
PREPARACIÓN DE MATERIAL MEDIOS Y REACTIVOS

RECICLADO DEL MATERIAL DE VIDRIO O POLIPROPILENO

Revisar las recomendaciones para operar el autoclave en el Anexo I de este Manual

- Antes de lavar el material utilizado para procesar muestras o suspensiones bacilares (pipetas, morteros, tubos, etc.), asegurarse que hayan sido autoclavados una hora a 121 °C dentro de los mismos recipientes donde fueron retirados del laboratorio, en el autoclave utilizado para material contaminado. Para evitar confusiones y asegurar la decontaminación eficiente, es muy conveniente identificar el material autoclavado por el viraje de color de una cinta indicadora de esterilidad.
- Asegurar que se hayan limpiado con un paño o algodón embebido en hipoclorito de sodio 1% el exterior de los frascos y recipientes utilizados para dispensar soluciones estériles dentro o fuera de la cabina de seguridad biológica, antes de sacarlos del área de procesamiento de las muestras y enviarlos a lavar.
- Lavar el material de vidrio con agua caliente (+70°C) y detergente (si es posible no iónico), cepillar para eliminar restos de material, enjuagar varias veces con agua caliente y finalmente con agua destilada. Todo residuo es potencialmente perjudicial para la actividad de un reactivo y el desarrollo de la bacteria.
- Si algún residuo biológico (sangre, medio de cultivo) es resistente a ese proceso de lavado, por excepción, sumergir las pipetas, frascos o tubos en alguna solución ácida concentrada como bicromato de potasio con ácido sulfúrico (solución sulfocrómica) durante unas 4 horas, lavar 3 veces con agua jabonosa, enjuagar 3 veces con agua común y otras 3 veces con abundante agua destilada.
- Acondicionar las pipetas dentro de recipientes porta pipetas, asegurar su tapa sin ajustarla herméticamente para permitir su esterilización.
- Asegurar las tapas de los tubos sin ajustarlas herméticamente para permitir su esterilización, acondicionarlos dentro de canastos
- Una vez limpio y acondicionado, esterilizar el material de vidrio, en el autoclave que se utilice para material limpio, a 121 ° C, durante 15 minutos.
- Secar el material en estufa
- Identificar el material estéril, separarlo, y guardarlo en lugar protegido.

SOLUCIÓN DE LIMPIEZA SULFOCRÓMICA

Dicromato de potasio	g	60
Agua destilada estéril c.s.p	ml	300

Calentar suavemente para disolver

Dejar enfriar

Agregar con mucho cuidado 460 ml de ácido sulfúrico sobre la solución (no al revés).

PRECAUCIONES GENERALES PARA PREPARAR SOLUCIONES

- Conservar los reactivos químicos y drogas siguiendo las indicaciones del fabricante, cuidando que estén en un lugar fresco (si no necesitan refrigeración especial) y seco. Archivar ordenadamente los folletos con especificaciones técnicas provistas por el fabricante.
- Utilizar una balanza que asegure una precisión de 0,1g o más, calibrada
- No superar la carga máxima que la balanza puede pesar
- Verificar que la balanza esté limpia, equilibrada, en un lugar firme, estable y sin vibraciones o corrientes de aire.
- Periódicamente, controlar que la pesada sea exacta utilizando una pesa de referencia o alguna sustancia pesada en otra balanza que está bien calibrada.
- Verificar que las moléculas de agua que contiene la droga a pesar coincidan con las que consigna la fórmula del medio o reactivo. En caso contrario, hacer la corrección necesaria para mantener la misma cantidad de droga pura (sin agua) que requiere la fórmula**.**
- Cada vez que se reciba una droga de marca desconocida, verificar que su empleo no altera la calidad del reactivo o medio, comparando el resultado de un lote preparado con el nuevo producto con relación a un lote preparado con la marca que se estaba utilizando anteriormente.
- Para pesar dispensar cada droga sobre un papel o un recipiente pequeño y muy liviano, muy limpio y previamente tarado, ubicado sobre el platillo de la balanza. Con una espátula muy limpia, agregar la droga de a poco, hasta alcanzar la cantidad necesaria. No reintegrar excedentes tomados con la espátula al frasco que contiene la droga para evitar contaminarla.
- Si es necesario, calentar suavemente las soluciones para disolver completamente, sobre una tela metálica o dentro de una estufa de incubación. Este proceso es innecesario para soluciones que serán autoclavadas.
- Cuidar la temperatura y tiempo de esterilización de las soluciones, los carbohidratos y otras sustancias termolábiles pueden degradarse.

CONSERVACIÓN DE MEDIOS Y SOLUCIONES

- Destinar un refrigerador con buena capacidad para mantenerlos.
- No mantener más de dos meses a los medios. Las soluciones estériles tienen en general duración prolongada.
- Puede ser conveniente proteger las cajas conteniendo medios con una tapa o bolsa plástica para evitar la desecación.
- Las cajas plásticas y bolsas utilizadas para preservar los medios deben estar muy limpias y desinfectadas.
- Mantener muy limpio y desinfectado el refrigerador, libre de moho. De lo contrario se producen contaminaciones masivas de los medios envasados.

MEDIOS A BASE DE HUEVOS

			Lowenstein Jensen	Stonebrink	Ogawa	Ogawa Kudoh (ácido)
Solución salina	Fosfato monopotásico KH_2PO_4	g	2,4	3,5	6	12
	Fosfato disódico $HNa_2\ PO_4$	g		1,6		
	Sulfato de magnesio $SO_4Mg.\ 7H_2O$	g	0,24			
	Citrato de Magnesio	g	0,6			0,6
	Glutamato de sodio	g			6	3
	Piruvato de sodio	g		6,25		
	L-asparragina	g	3,6			
	Glicerol	ml	12		36	24
	Agua destilada c.s.p	ml	600	500	600	600
Huevos		ml	1000	1000	1200	1200
Verde de malaquita 2%		ml	20,0	20,0	36	24
pH aproximado			6,8	6,8	6,8	6,2

Conservando las proporciones, adecuar el volumen de cada lote según el número de muestras que procese el laboratorio. Preparar lotes como para cubrir la necesidad de no más de 2 meses de trabajo

Solución de verde de malaquita 2%

Verde de malaquita	g	2
Agua destilada estéril c.s.p	ml	100

Disolver colocando la solución en estufa de incubación durante 1-2 horas. Alicuotar en tubos tapa rosca en la cantidad necesaria para preparar cada lote. Conservar en un lugar fresco y al abrigo de la luz. Descartar y preparar solución fresca en el caso en que se observe precipitado o cambio de color

- Preparar y esterilizar la solución salina en autoclave a 1 atmósfera, 121°C, durante 15 minutos. Dejar enfriar. Mantener en heladera hasta el momento de uso
- Proveerse de huevos frescos (en lo posible de no más de 7 días) y que provengan de granjas donde no se utilicen alimentos para gallinas que contengan antibióticos activos contra las micobacterias. Sumergir los huevos en agua con jabón durante 30 minutos en el momento de recibirlos, limpiarlos con cepillo, enjuagarlos bajo agua corriente, dejarlos secar. Mantenerlos dentro de un recipiente plástico limpio, en heladera, hasta el momento de uso.
  Una manera práctica para descartar huevos que no sean frescos es sumergirlos en abundante agua fría. Los que no estén en buenas condiciones flotaran mientras que los huevos frescos e íntegros quedaran en el fondo del recipiente.

Método de preparación

- Precalentar el coagulador a 80°C. Mantener bajo estricto control esta temperatura hasta finalizar el proceso de coagulación
- Sumergir los huevos en un recipiente con etanol al 70% pocos minutos antes de utilizarlos. Sacarlos y dejar secar sobre una bandeja muy limpia. Se puede también utilizar un algodón embebido en alcohol para frotar la superficie de cada huevo. Para estimar la cantidad de huevos necesarios, considerar

que cada huevo contiene unos 18 ml, de manera que para completar un litro de huevos serán necesarios unos 20 a 25 huevos.

- Preparar el área de trabajo y los materiales
  Operar cerca de un mechero o dentro de una cabina con flujo laminar para mantener estéril el ambiente donde se mezclan los componentes del medio y se dispensa en los tubos
  Limpiar la mesada de trabajo y desinfectarla con solución hipoclorito 1%
  En el caso de utilizar mechero, flamear las bocas de los recipientes de vidrio y tubos inmediatamente después de quitar su tapa y antes de volver a taparlos
  Ubicar al lado del mechero o dentro de una cabina de esterilidad todo el siguiente material estéril, con capacidad adecuada al volumen de lote que se esté preparando
  - un mortero o vaso de precipitado estéril
  - una probeta graduada estéril
  - la solución salina estéril
  - el recipiente para homogeneizar y un batidor estériles. Si se dispone de una licuadora u homogeneizador, se utilizará el vaso y el batidor de este equipo.
  - un embudo cubierto con gasa o un filtro grande, estériles.
  - un recipiente estéril para dispensar el medio. Puede ser un kitasato con un tubo de silicona cerrado por una pinza de Mohr en su salida inferior o un erlenmeyer con una tubuladura de silicona conectada a una bomba peristáltica (si se dispone una).
  - los huevos limpios e impregnados con alcohol

  Acercar las cajas conteniendo los tubos estériles con tapa de rosca donde será envasado el medio
- Lavarse las manos
- Cascar un huevo, y descargar el contenido en un recipiente (mortero o vaso de precipitado) para controlarlo. Si está en buen estado y fresco, trasvasarlo a una probeta graduada. Proseguir de la misma forma con el resto de los huevos hasta completar el volumen necesario.
- Volcar la solución salina, los huevos y la solución de verde de malaquita en el recipiente para homogeneizar o vaso de la licuadora Homogeneizar la mezcla con el batidor hasta que no se vea ningún grumo y el color sea uniforme en toda la preparación. Si el recipiente no tiene capacidad suficiente para contener todos los componentes del medio, batir primero los huevos y mezclarlos luego, en un recipiente mas grande, con la solución salina hasta que lograr un aspecto uniforme.
- Ubicar el embudo cubierto con gasa en la boca del kitasato o erlenmeyer con la tubuladura para dispensar el medio. Filtrar el medio de manera que quede retenidas las partículas del huevo no desintegradas.
- Dejar reposar unos minutos para que las burbujas de aire asciendan a la superficie y desaparezcan
- Homogeneizar la suspensión por agitación manual suave el kitasato o erlenmeyer
- Dispensar en cada tubo un volumen suficiente como para que al inclinarlo en el estante del coagulador forme un pico de flauta desde la base del tubo hasta unos 2 cm por debajo del borde (aproximadamente 6 a 7 ml, en tubos de 16 x 150 mm y 7 a 8 ml en tubos de 20 x 150 mm. Evitar formar burbujas al dispensar.
- Mezclar con frecuencia el medio moviendo manualmente el recipiente para evitar que decante, sin formar burbujas.
- Ubicar los tubos en el coagulador dentro de los 15 minutos de envasados para evitar que decante el medio dentro del tubo.
- Mantener los tubos a 80°C en el coagulador durante 40-45 minutos, en posición inclinada. **Controlar estrictamente el tiempo y la temperatura de coagulación. Las burbujas o la decoloración del medio indican que la temperatura ha sido excesiva. Descartar partidas coaguladas, por cualquier razón, a muy alta temperatura o durante tiempo excesivo.**
- Tomar un tubo al azar de cada estante del coagulador, incubar esta muestra a 37°C durante 48 horas y dejarlos a temperatura ambiente durante las subsiguientes 48 horas, para controlar la esterilidad
- Ubicar el resto de los tubos en una caja de plástico, muy limpia y desinfectada con solución hipoclorito de sodio 1 %, rotulada con el nombre del medio y número de lote

- Conservar en un refrigerador a 4°C., al abrigo de la luz.
- Registrar el lote, fecha de preparación y volumen.
- Disponer que se haga el control de sensibilidad del lote.
- Registrar el día en que se pone en uso y el día en que se termina cada lote.

Los tubos pueden ser despachados a otros laboratorios a temperatura ambiente en tanto que estén protegidos de la luz solar, sobre calentamiento y desecación

MEDIOS SINTÉTICOS DE LA SERIE MIDDLEBROOK

Pueden ser preparados desde su fórmula pero esto es complejo. Dado que el incremento del costo de este tipo de medios está determinado principalmente por el enriquecimiento y no tanto por el medio base, se aconseja utilizar bases deshidratadas de origen comercial que simplifican mucho el trabajo

Caldo Middlebrook 7H9

Caldo "base" sin enriquecimiento

Preparar de acuerdo a las instrucciones de la firma comercial

Base Middlebrook 7H9	g	0.94
Glicerol	ml	0.4
Agua destilada c.s.p.	ml	180

Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 15 minutos. Conservar a 4°C

Si se va a agregar el enriquecimiento en el día, dejar enfriar el caldo antes de hacerlo

Caldo enriquecido

Caldo base	ml	180
Enriquecimiento ADC	ml	20

El enriquecimiento contiene, por litro, 8,5 g de NaCl, 50 g de albúmina (fracción V), 20 g de dextrosa y 0,03 g de catalasa

- Distribuir en tubos con tapa a rosca, al menos 5 ml y hasta 15 ml en cada uno, cuidando rigurosamente la esterilidad.
- Tomar una muestra al azar de los tubos e incubarlos a 37°C durante 48 horas y dejarlos a temperatura ambiente durante las subsiguientes 48 horas, para controlar la esterilidad
- Ubicar el resto de los tubos en una caja de plástico, muy limpia y desinfectada con hipoclorito de sodio 1%, rotulada con el nombre del medio y número de lote
- Conservar en un refrigerador a 4°C, al abrigo de la luz.
- Registrar el lote, fecha de preparación y volumen.
- Disponer que se haga el control de sensibilidad del lote.
- Registrar el día en que se pone en uso y el día en que se termina cada lote

Agar Middlebrook 7H11

Agar "base" sin enriquecimiento

Preparar de acuerdo a las instrucciones de la firma comercial

Base Middlebrook 7H11	g	4.2
Glicerol	ml	1
Agua destilada c.s.p	ml	180

Esterilizar en autoclave a 1 atmósfera durante 15 minutos

Dejar enfriar a 50-55 °C

Agregar el enriquecimiento asépticamente

Agar enriquecido

Caldo base	ml	180
Enriquecimiento OADC (*)	ml	20

El enriquecimiento contiene por litro 50 g de albúmina (fracción V), 20 g de dextrosa, 0,03 g de catalasa y 0,6 acido oleico, en solución acuosa. Esta mezcla no puede ser esterilizada por calor porque se destruye la albúmina, sino por filtración. El producto de origen comercial es provisto en forma estéril.

Distribuir rápidamente el medio en tubos con tapa a rosca o placas de Petri, cuidando rigurosamente la esterilidad. Inclinar cada tubo de inmediato para que forme un pico de flauta. No conviene preparar lotes de mayor tamaño porque el agar solidifica rápidamente lo que dificulta las operaciones. No es aconsejable volver a fundir el medio por calor luego de solificado porque este procedimiento disminuye su calidad.

Para examinar con lente de aumento los cultivos de

muestras seleccionadas, el medio puede ser distribuido en volúmenes de 5 ml dentro de placas de Petri desechables de 60 x 15 mm

- Tomar una muestra al azar de los tubos o placas e incubarlos a 37°C durante 48 horas y dejarlos a temperatura ambiente durante las subsiguientes 48 horas, para controlar la esterilidad
- Ubicar el resto de los tubos o placas en una caja de plástico, muy limpia y desinfectada con hipoclorito de sodio 1 %, rotulada con el nombre del medio y número de lote
- Conservar en un refrigerador a 4°C, al abrigo de la luz.
- Registrar el lote, fecha de preparación y volumen.
- Disponer que se haga el control de sensibilidad del lote.
- Registrar el día en que se pone en uso y el día en que se termina cada lote

Mezcla de antibióticos

PANTA

Es una mezcla de antibioticos que se comercializa en forma liofilizada y puede ser agregada al medio Middlebrook 7H9 y MGIT (*Mycobacteria Growth Indicador Tube*). Luego de reconstituida en agua, la mezcla contiene por ml de solución

Polimixina B	2000 unidades
Anfotericina B	200 µg
Ácido **n**alidixico	800 µg
Trimetoprima	200 µg
Azlocilina	200 µg

Se agrega 0,1 ml de esta solución por cada 5 ml de medio. La solución debe debe ser utilizada dentro de las 72 hs después de reconstituida la mezcla de antibióticos.

Para el medio Middlebrook 7H11 suele utilizarse la siguiente mezcla de antibióticos, por cada 200 ml de medio

Polimixina B	40.000 unidades
Carbenicilina	10 mg
Ánfotericina B	2 mg
Trimetropima	4 mg

Las mezclas de antibióticos pueden ser preparadas a partir de cada antibiótico en laboratorios muy experimentados en pruebas de sensibilidad y con freezer. Las soluciones madres de cada antibiótico, conteniendo 100.000 µg/ml, deben ser alicuotadas y mantenidas a -20°C o preferentemente -70°C. De esta forma, cada alícuota será empleada una sola vez y luego descartada, Se evita así el deterioro del antibiótico por congelamiento y descongelamiento. A partir de estas soluciones madres, en el día de uso, se hacen las diluciones necesarias para alcanzar las concentraciones indicadas en cada medio, en agua destilada estéril

BUFFER FOSFATO pH 6,8 M/15

Solución 1	Fosfato disódico anhidro $HNa_2 PO_4$	g	9.46
	Agua destilada c.s.p	ml	1000
Solución 2	Fosfato monopotásico KH_2PO_4	g	9.08
	Agua destilada c.s.p	ml	1000

Preparar la solución 1 y la 2, calentando ligeramente cada una por separado hasta lograr completa disolución de las sales.

Mezclar igual volumen de la solución 1 y 2

Controlar el pH

Para procesar muestras, fraccionar el buffer así preparado en botellas o frascos conteniendo no más de 200 ml cada uno. Esta cantidad es adecuada para el procesamiento de 12 muestras

Esterilizar las botellas en autoclave 15 minutos a 1 atmósfera

Rotular con el nombre del buffer y fecha de preparación. Guardar en heladera

SOLUCIONES DECONTAMINANTES

Utilizar guantes para prepararlas. El álcali puede causar quemaduras o irritar los ojos y la piel

En caso de contacto con la piel, lavar inmediatamente con abundante agua

Hidróxido de sodio 4% para el Método de Petroff modificado

Hidróxido de sodio (NaOH)	g	40
Agua destilada estéril	ml	1000

Disolver bien

Fraccionar en tubos, botellas o frascos conteniendo no más de 50 ml cada uno. Esta cantidad es adecuada para el procesamiento en promedio de 12 muestras. Fraccionar en alícuotas menores si la cantidad de muestras a procesar en el día es menor a 12.

Esterilizar las botellas o tubos en autoclave 15 minutos a 1 atmósfera.

Rotular con el nombre del reactivo y fecha de preparación. Guardar en refrigeración hasta el momento de uso.

Solución decontaminante para el método NALC NaOH

Hidróxido de sodio. (NaOH)	g	20
Citrato trisódico ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	g	14,5
Agua destilada estéril	ml	1000

Fraccionar en tubos, botellas o frascos conteniendo no más de 50 ml cada uno. Esta cantidad es adecuada para el procesamiento, en promedio, cerca de 12 muestras. Fraccionar en alícuotas menores si la cantidad de muestras a procesar en el día es menor a 12

Esterilizar las botellas en autoclave 15 minutos a 1 atmósfera

Rotular con el nombre del reactivo y fecha de preparación. Guardar en heladera hasta el momento de uso

En el momento de uso agregar 0,25 g de N-acetil cisteina a cada 50 ml de solucion. Mezclar y utilizar

Conviene tener pesada la N-acetil cisteina en la cantidad necesaria para agregar a cada tubo

Solución de cloruro de cetilpiridinio en cloruro de sodio, para el transporte de muestras durante un tiempo prolongado

Cloruro de sodio	g	4
Cloruro de cetilpiridinio	g	2
Agua destilada estéril	ml	200

Fraccionar en tubos estériles conteniendo 5 ml cada uno. Mantener dentro de un recipiente oscuro al abrigo de la luz. Rotular con el nombre del reactivo y fecha de preparación

Esta cantidad es adecuada para el procesamiento, en promedio, cerca de 40 muestras. La solución es auto esterilizante y se conserva estable a temperatura ambiente si el calor no es excesivo.

REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE NIACINA

Los reactivos son tóxicos y cancerígenos. Para prepararlos, trabajar en una campana de extracción y utilizar guantes.

Bromuro de cianógeno 10 %

Bromuro de cianógeno en cristales (BrCN)	5 g
Agua destilada c.s.p	50 ml

Agregar los cristales al agua y tapar el recipiente. Dejarlo a temperatura ambiente en la campana de extracción o en un lugar bien ventilado durante 24 horas para que disuelva. No calentar la solución

Para evitar manipulación innecesaria con el bromuro de cianógeno pesarlo dentro de un frasco liviano de 100 ml de capacidad

Si no se tiene acceso al bromuro de cianógeno en cristal, puede ser preparado de la siguiente forma

Cianuro de potasio al 4%

Cianuro de potasio (KCN)	2 g
Agua destilada c.s.p	50 ml

Controlar que el cianuro no esté hidratado

Preparar el día de uso

Disolver por simple agitación

Agua de bromo

Utilizar un botellón de vidrio oscuro, de 1 o 2 litros, boca ancha y con tapón de vidrio de cierre hermético.

Volcar en él 300 ml de agua destilada.

Limpiar por fuera una ampolla de bromo. Sumergirla en el botellón y romperla bajo el agua. El bromo, por su peso, permanecerá en el fondo, junto con el vidrio de la ampolla roto. El agua fría impide el desprendimiento de vapores. Tapar muy bien el frasco y colocarlo dentro de una caja plástica o de cartón, en un lugar aireado, fresco y lejos de elementos que pueda corroer.

Bromuro de cianógeno

Pipetear desde el fondo de agua de bromo 1 ml de bromo y transferirlo a un erlenmeyer de 250 ml.

Agregar cianuro de potasio al 4%, rotando la solución continuamente hasta completa decoloración. Agregar gota a gota en el punto cercano a la decoloración. Si se agrega exceso de cianuro de potasio, la reacción es irreversible y es necesario descartar la solución.

Alicuotar el bromuro de cianógeno en frascos de vidrio en volúmenes cercanos a 1 ml. Tapar herméticamente. Rotular y conservar a 4° o preferentemente a –20 °C porque a más baja temperatura se conserva activo por más tiempo y al estar congelado no desprende vapores. Preparar la cantidad necesaria para no más de 2 meses de trabajo si se conserva a 4 °C, y para 6 meses si se conserva a –20 °C

Agregar hidróxido de sodio 4% dentro de los recipientes utilizados para la preparación y enjuagar con abundante agua antes de lavar, para evitar que se forme ácido cianhídrico que es extremadamente tóxico. Limpiar cuidadosamente todo resto de reactivo

Anilina al 4%

Utilizar guantes para preparar

Anilina	2 ml
Etanol	48 ml

Se puede reemplazar por sal sódica del ácido p-amino salicílico (PAS- sodio) al 1%.

Conservar la anilina original y la solución al 4% en frasco color ámbar, al abrigo de la luz, a temperatura ambiente

REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE CATALASA

Tubos con buffer pH 6,8

Trabajar en esterilidad.

Mezclar en partes iguales las soluciones 1 y 2 estériles (ver buffer fosfato pH 6,8) para preparar el volumen necesario para un mes de trabajo.

Distribuir 0,5 ml en tubos de vidrio pequeños con tapa a rosca

Ubicar en una caja rotulada. Conservar en refrigeración hasta el momento de uso

Tween 80 al 10%

Tween 80	5 ml
Agua destilada	45 ml

Calentar la pipeta para tomar el tween que es muy denso.

Mezclar y autoclavar a 1 atmósfera, 15 minutos.

Dejar enfriar. Resuspender por agitación. Mantener en refrigeración.

El reactivo completo se prepara en el momento de uso mezclando partes iguales de Tween 80 al 10% con peróxido de hidrógeno 30% (H_2O_2, 100 volúmenes)

SUSTRATO Y REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE NITRATO REDUCTASA

Sustrato

Nitrato de sodio ($NaNO_3$)	255 mg
Buffer fosfato M/15 pH7	100 ml
Agua destilada	200 ml

Distribuir 2 ml en tubos con tapa a rosca pequeños.

Autoclavar 15 minutos a 1 atmósfera

Rotular

Guardar en refrigeración

Reactivos

Solución 1

Acido clorhídrico (ClH)	25 ml
Agua destilada	25ml

Agregar siempre el ácido sobre el agua. No al revés

Solución 2

Äcido sulfanílico ó sulfanilamida	100 mg
Agua destilada	50 ml

Solución 3

n-1 naftiletilendiamida dihidrocloruro	50 mg
Agua destilada	50 ml

Guardar las 3 soluciones en frasco color ámbar

Conservar en heladera

ANEXO V
MODELOS DE FORMULARIOS Y REGISTROS

SOLICITUD DE: BACILOSCOPIA ❑ CULTIVO ❑ PRUEBA DE SENSIBILIDAD ❑

Establecimiento(1) Fecha: ...../...../.....

Apellido y nombres del paciente..... Edad: ..... Sexo: F ❑ M ❑

Numero de registro ..... Dirección completa del paciente: .....

.....

Motivo del examen

Para Diagnóstico ❑ muestra 1ª ❑ 2ª ❑ 3ª ❑ ..... ❑

Para control de tratamiento ❑ mes de tratamiento: .....

Muestra: ……

Motivo para el cultivo

Sintomático respiratorio con dos o mas muestras de esputo con baciloscopia negativa	❑
Baciloscopia de esputo positiva después de finalizado el segundo mes de tratamiento	❑
HIV positivo	❑
Enfermedad extrapulmonar	❑
Otro (describa) …….....	❑

Motivo para la prueba de sensibilidad

Historia de tratamiento(s)) antituberculoso(s)	❑
Contacto de paciente con tuberculosis resistente a las drogas de primera línea	❑
HIV positivo	❑
Otro (describa) …….....	❑

Nombre del solicitante …….. Firma :.....

(1) Incluye a todos los proveedores de salud (públicos, privados, del seguro de salud, sistema penitenciario etc)

RESULTADO DE LA BACILOSCOPIA

(A ser completado en el laboratorio)

Método Ziehl Neelsen ❑

Fecha de recoleccion	Muestra	Aspecto (*)	Resultado				
			negativo	Positivo			
				1 a 9 BAAR	+	++	+++
	1						
	2						
	3						

(*) Saliva, mucopurulenta, sanguinolenta , licuada

Examinado por: ..... Firma: …… Fecha: ……./……./……..

RESULTADO DE CULTIVO

Apellido y nombres del paciente:..... Numero de Registro: …..

Establecimiento que envió la muestra: ..... Muestra(s) examinada (s).....

Método: Petroff modificado

Resultado

Fecha de recolección	Muestra	Resultado					
		negativo	Positivo				
			1-19 colonias	+	++	+++	Contaminado
	1						
	2						
	3						

El desarrollo tiene /no tiene características compatibles con *Mycobacterium tuberculosis*
Observaciones: .....

Informado por ..... Firma …… Fecha: ……./……./……..

RESULTADO DE IDENTIFICACION DEL AISLAMIENTO

Apellido y nombres del paciente:..... Numero de Registro. …..

Establecimiento que envió la muestra: ..... Muestra(s) examinada (s).....

Identificación

	Positivo	Negativo
Niacina	❑	❑
Catalasa a 68°C	❑	❑
Nitrato reductasa	❑	❑

Se identifica como *Mycobacterium tuberculosis* ❑ Una micobacteria ambiental ❑

Observaciones: .....

Informado por ..... Firma …… Fecha: ……./……./……..

En el caso de pacientes HIV positivos se seguirán las normas vigentes en cada país para la identificación del paciente, salvaguardando la confidencialidad de la información

REGISTRO DEL CULTIVO EN EL LABORATORIO DE TUBERCULOSIS

Servicio de salud: _____ Domicilio: _____

Nº registro del laboratorio	Fecha			Appellido y Nombre	Sexo F/M	Edad	Dirección completa (pacientes de diagnóstico)	Nº de Registro	Motivo del examen		Nombre del establecimiento que envía la muestra	Muestra	Aspecto (*)	Resultado de la bacilos-copia	Resultado del cultivo						Informe		Derivado a (fecha)
															Lowenstein Jensen		Stonebrink		Velocidad de desarrollo (lento o rápido)	Morfología pigmen-tación de la colonia			
	Toma de muestra	Recep-ción de muestra	Fecha de inocu-lación						Diagnós-tico	Control de trata-miento (registrar mes)					desarrollo observado y fecha						Fecha	Informe	

(*) S Salva
MP Mucupurulenta
Sang Sanguinolenta
L Licuada

REGISTRO DE RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS

Aislamiento de la muestra N° de orden	Identificación								Observaciones	Informe Definitivo		Derivado a (fecha)
	Ziehl Neelsen		Nitacina		Catalasa 68°C		Nitrato reductasa			Fecha	Informe	
	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado		Resultado				

FORMULARIO PARA LA DERIVACIÓN DE UN AISLAMIENTO O MUESTRA AL LABORATORIO (NACIONAL) DE REFERENCIA PARA IDENTIFICACIÓN Y/O PRUEBA DE SENSIBILIDAD

La información requerida en este formulario es la mínima que precisa el laboratorio de referencia para sustentar la elección de los estudios y métodos a aplicar y para comunicarse con la institución que deriva el estudio. La falta de información puede derivar en que no se utilicen los recursos diagnósticos adecuados para el caso en cuestión y en que no se transmitan oportunamente los resultados.

Establecimiento .....

Dirección Postal .....

Teléfono ..... **Fax** ..... **E-mail** .....

MATERIAL ENVIADO

❏ Muestra de
❏ Aislamiento (cultivo) desarrollado a partir de

❏ **esputo**	❏ **Orina**	❏ **biopsia de** .....
❏ **lavado bronquial/ broncoalveolar**	❏ **Sangre** ❏ **ganglio**	❏ **Otras** .....
❏ **biopsia pleural**	❏ **líquido cefalorraquídeo**	

El resultado de la baciloscopia de la muestra fue.....

El cultivo creció en medio ..... y..... a los ..... días de incubación, con un desarrollo de (número de colonias) ..... y tenía/no tenía pigmentación .

El aislamiento fue identificado como .....

Se envía el material para .....
.....
.....

DATOS DEL PACIENTE

Apellido..... ***Nombre***.....
Edad.....***Sexo*** ..... ***Ocupación*** .....

Lugar de residencia actual .....,.....
anterior .....

Tuvo exposición a la tuberculosis en .....

En contacto con .....

Serología para HIV ❑ **Positiva**
❑ **Negativa**
❑ **No realizada**
❑ **Se desconoce**

Enfermedades asociadas

❑ **diabetes**
❑ **enfermedad maligna**
❑ **inmunosupresión por ……..**
Procedimientos invasivos
❑ **prótesis/implanate** ❑ **transplante** ❑ **inyecciones reiteradas**
❑ **otra ……..**

Tuvo Internaciones reiteradas en las siguientes instituciones

.....
.....
.....

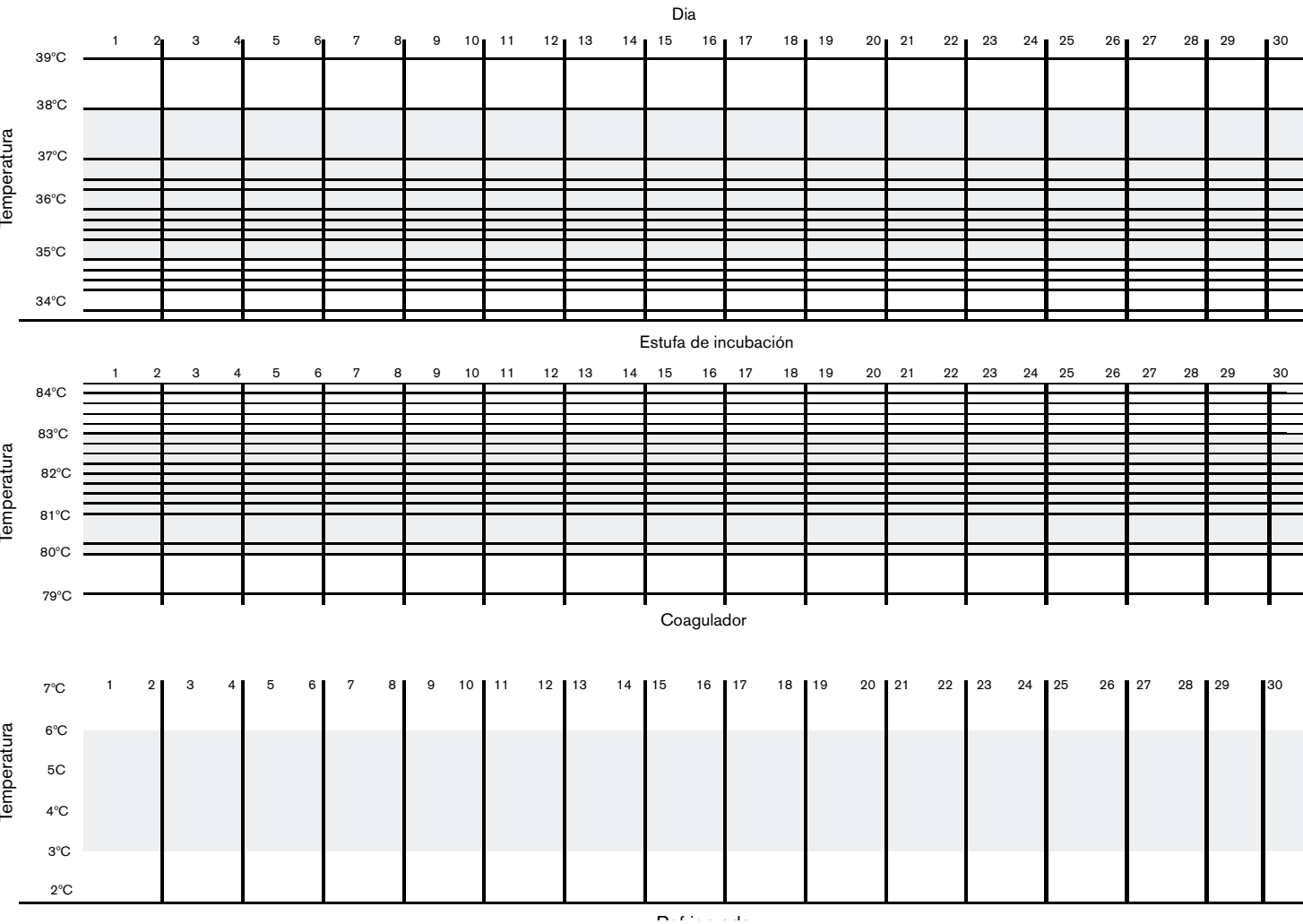
Tiene antecedentes de	
❑	**enfermedad pulmonar crónica ¿cuál? .....**
❑	**tratamiento con drogas antituberculosas**
y de	❑ **abandono de tratamiento** ❑ **cumplimiento irregular de tratamiento** ❑ **haber recibido algún esquema irregular de drogas**

El tratamiento actual fue iniciado el mes de ..... de .....
Se le administró las siguientes drogas **.....**
.....

Resultados de Estudios Bacteriológicos anteriores						
Fecha	**Muestra estudiada**	**Baciloscopia**	**Cultivo**	**AISLAMIENTO**		
				Identificado como	**Sensible a**	**resistente a**

Fecha ...../...../..... Firma y aclaración: .....

REGISTRO DE TEMPERATURAS



REGISTRO DE ELABORACIÓN O RECEPCIÓN

CONTROL DE CALIDAD Y CONSUMO DE MEDIOS DE CULTIVO

Medio: Lowenstein Jensen

Lote N°	Volumen ml	Fecha			Control Esterilidad	Control Sensibilidad				
		elaboración o recepción	se comenzó a utilizar	se acabó	se detectó desarrollo?	cepa/ muestra sembrada	Desarrollo 20 días (colonias)		Desarrollo 60 días (colonias)	
							lote control	este lote	lote control	este lote

EVALUACIÓN DE RESULTADOS DE CULTIVO

Casos de tuberculosis investigados para diagnostico mediante el examen de muestra(s) de esputo

Período analizado	a. Baciloscopia (+) y cultivo (+)	b. Baciloscopia (+) y cultivo no realizado	c. Baciloscopia (-) y cultivo (+)	d. Baciloscopia (+) y cultivo (-)	e. Baciloscopia (+) y cultivo contaminado	f. Baciloscopia no realizada y cultivo (+)	Aporte del cultivo % (*)

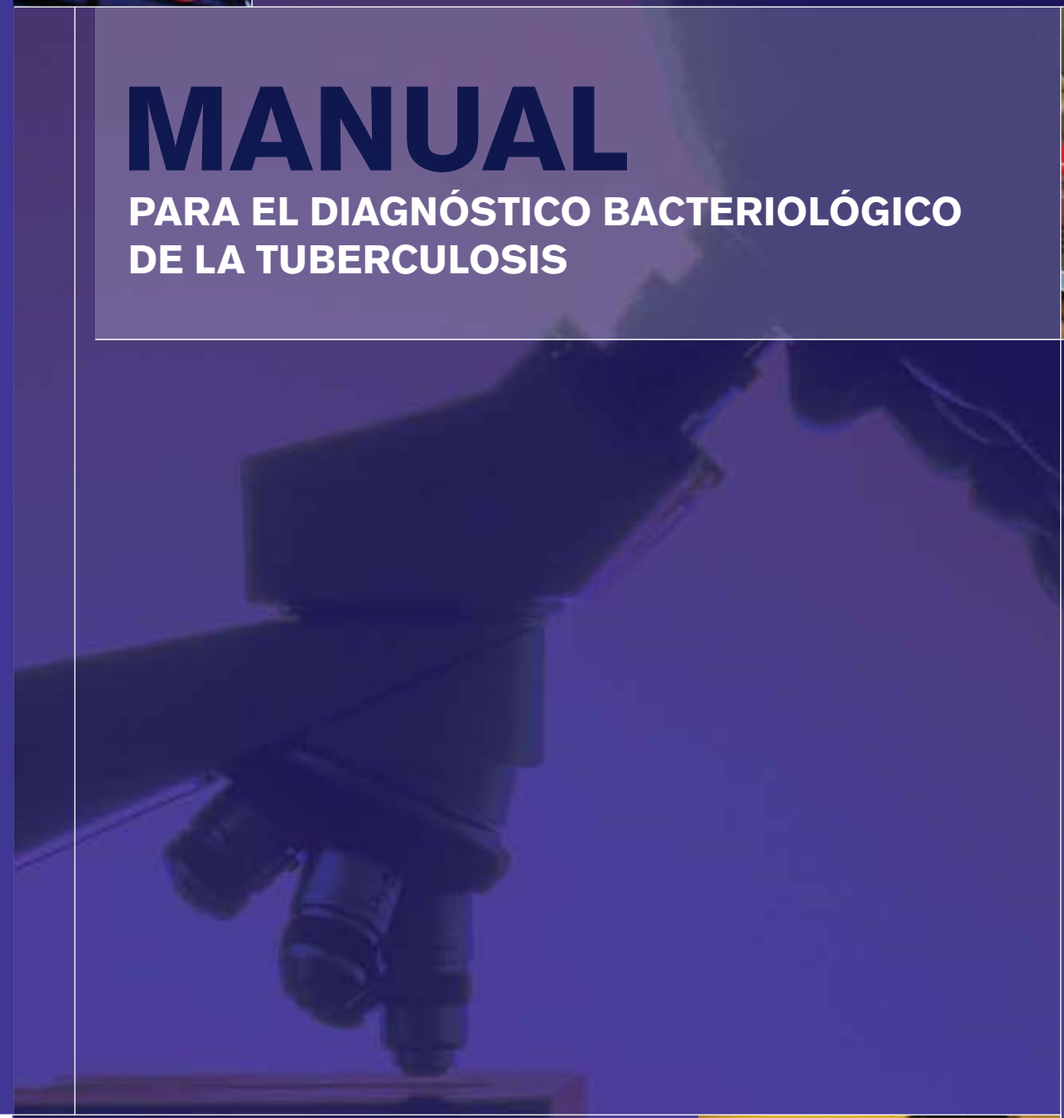
Aporte del cultivo al diagnóstico =

$$\frac{c}{a+b+c+d+e} \times 100$$

NORMAS Y GUÍA TÉCNICA

MANUAL

PARA EL DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS



Organización Panamericana de la Salud

Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud

USAID DEL PUEBLO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

PARTE 2 Cultivo

Organización Panamericana de la Salud

Oficina Regional de la Organización Mundial d