



EHAS
ENLACE HISPANO AMERICANO DE SALUD

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS RESPIRATORIAS PARA DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS (baciloscopia)

Proyecto AECID 2012

*“Nuevos procedimientos para el diagnóstico de enfermedades olvidadas
utilizando tele-microscopía de bajo coste”.*





TABLA DE CONTENIDOS

ANTES DE COMENZAR

Características de la muestra.
Precauciones a tener en cuenta.
Eliminación de muestras y residuos.
Cuándo debe tomarse la muestra.
Cómo debe recogerse la muestra.

TOMA DE LA MUESTRA

Registro de la muestra.

PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Material necesario.
Preparación de la muestra para ser teñida.
Tinción de Ziehl-Neelsen.

OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO

FUENTES FIGURAS



MICROORGANISMO	MÉTODO	OBSERVACIONES
Bacilos tuberculosos	Tinción de Ziehl-Neelsen	Precauciones por su elevada contagiosidad: una vez realizado el examen, las muestras y los materiales deben ser incinerados.

ANTES DE COMENZAR

CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

La muestra más adecuada para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar es el **esputo obtenido por expectoración espontánea**, tras un golpe de tos profunda. Estas muestras son generalmente de consistencia espesa y mucoide, de color variable (desde blanquecinas hasta verdosas) e incluso sanguinolentas.

Las muestras de saliva, secreciones nasales o faríngeas NO son muestras adecuadas para el diagnóstico de tuberculosis, aunque pueden examinarse por la posibilidad de que hayan quedado bacterias retenidas en esas zonas (boca, faringe) tras la tos.

Si el paciente no lograra expectorar, se puede recurrir a la expectoración inducida que debe ser siempre supervisada por personal médico.

PRECAUCIONES A TENER EN CUENTA

La tuberculosis es una enfermedad de **elevada contagiosidad**. Ya que las muestras de esputo pueden contener bacilos tuberculosos, es muy importante obtenerlas bajo condiciones en las que la probabilidad de contagio sea mínima, por ello las muestras deben obtenerse:

- En una **habitación bien ventilada** o incluso al aire libre lejos de otras personas.
- **No se debe obtener la muestra en espacios o habitaciones cerradas**, sin ventilación y concurridos.
- El personal sanitario encargado de la toma de la muestra debe protegerse mediante el empleo de una **mascarilla**.
- El área de trabajo debe estar recubierta de material que pueda desinfectarse de forma fácil con soluciones microbidas como fenol al 5% o hipoclorito de sodio al 1%. Si no se puede disponer de este tipo de superficie, **se pueden utilizar bandejas o cubrir la mesa con un vidrio o papel que luego puedan desecharse o desinfectarse** con facilidad.
- El área de trabajo **debe situarse alejada de la puerta y de lugares donde existan corrientes de aire**.



ELIMINACIÓN DE MUESTRAS Y RESIDUOS

Una vez terminada la lectura y anotados los resultados, las muestras deben desecharse en el mismo recipiente empleado para tirar el resto del material que se ha ido utilizando a lo largo del proceso (varillas, guantes, papel...). Este recipiente debe ser recogido por el servicio de recogida de material infeccioso para su posterior incineración.

Si no existe la posibilidad de la recogida del material por una empresa especializada el material debe desecharse de la siguiente forma:

- Colocar una bolsa de plástico impermeable en el interior del recipiente para desechar el material. Todo el material que se vaya utilizando (varillas, muestras, etc) se irá echando en esta bolsa.
- Una vez terminado el trabajo del día, la bolsa que está en el interior del recipiente se debe cerrar con un nudo y después cerrar el recipiente. Transportarlo hacia el lugar donde se vaya a incinerar (fosa al aire libre, etc).
- Sacar la bolsa cerrada del recipiente y depositarla en el lugar destinado a la incineración. Mantenerse alejado del fuego una vez que se encienda por la posible presencia de aerosoles peligrosos.
- Ponerse guantes y desinfectar el recipiente, tanto por dentro como por fuera, con fenol al 5%.

CUÁNDO DEBE TOMARSE LA MUESTRA

Puesto que la eliminación de estas bacterias es variable a lo largo del día, **cada paciente** con sospecha de tuberculosis debe recoger **3 muestras de esputo de entre 3-5 ml cada uno..** Las muestras se obtendrán de la siguiente manera:

- 1ª MUESTRA: Se tomará cuando el paciente acuda al puesto de Salud con sospecha de enfermedad tuberculosa.
- 2ª MUESTRA: La tomará el paciente al día siguiente en su domicilio, nada más despertar y en ayunas, enjuagándose previamente la boca.
- 3ª MUESTRA: Se tomará al entregar la segunda en el Puesto de Salud.

CÓMO DEBE RECOGERSE LA MUESTRA

El esputo debe depositarse en un **envase con las siguientes características:**

- Boca ancha (no menos de 5 cm de diámetro) para una adecuada recolección y posterior procesamiento de la muestra.
- Capacidad entre 30-50 ml.
- Cierre hermético, con tapa de rosca (evitará el derramamiento y la producción de aerosoles).
- Material plástico, desechable, resistente a roturas y transparente o semitransparente, para poder observar las características y calidad de la muestra sin necesidad de abrir el bote.
- El envase debe etiquetarse o rotularse con los datos del paciente. El etiquetado o rotulado debe hacerse siempre en la pared del bote, nunca en la tapa del mismo.





TOMA DE LA MUESTRA

- Dar al paciente el bote rotulado o etiquetado con sus datos.
- Indicar al paciente que se **enjuague la boca antes de emitir la muestra**.
- Explicar al paciente que es necesario obtener una muestra del tracto respiratorio inferior y que **no es válida la saliva**. Para ello habrá que indicar al paciente que inspire profundamente, retenga el aire por un instante breve y posteriormente elimine las secreciones con un golpe intenso de tos.
- Una vez obtenida la primera muestra, se facilitará al paciente un nuevo envase etiquetado o rotulado con sus datos, para que recoja la segunda muestra a la mañana siguiente en su domicilio y la entregue con la mayor rapidez posible en el puesto de Salud.
- Lo ideal es que las muestras, una vez obtenidas, **se procesen de forma inmediata** y que no pasen más de dos horas desde su obtención hasta la llegada al puesto de Salud.
- Si las muestras de esputo llegasen al laboratorio a una hora que no permita procesarlas en el día, se debe introducir cada uno de los envases en una **bolsa de polietileno que se anudará fuertemente** sobre la tapa del mismo. Posteriormente las muestras se introducirán en una caja de plástico que se colocará en un lugar fresco, seco y protegido de la luz.

REGISTRO DE LA MUESTRA

Una vez que la muestra de esputo está en el laboratorio, es importante anotar en una libreta los datos del paciente, la fecha de recepción y características de la muestra, así como el resultado del examen. De esta manera se puede obtener un registro y control del número de casos de tuberculosis en la zona.



PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

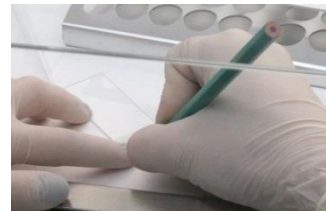
MATERIAL NECESARIO

- Guantes y mascarilla.
- Portaobjetos.
- Lápiz o marcador para los portaobjetos.
- Mechero de gas o alcohol.
- Varillas o palillos de madera.
- Reactivos para la tinción: Agua, Fucsina Fenicada, Alcohol Clorhídrico al 3% y Azul de Metileno.
- Recipiente con desinfectante (hipoclorito de sodio 1%, fenol 5%) para desechar el material utilizado.
- En caso de que la superficie de trabajo no pueda desinfectarse, serán necesario papel, vidrio o bandejas para cubrirla que luego han de desecharse o desinfectarse.

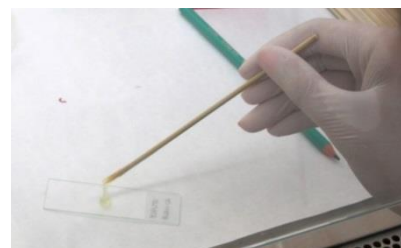
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SER TEÑIDA

- Rotular el portaobjetos con el nombre del paciente o sus iniciales y el n° de identificación de la muestra. No utilizar bolígrafo o rotulador, dado que se decoloran durante el proceso. Recuerde que **los portaobjetos deben ser siempre nuevos, nunca reutilizados.**

RAMÓN PÉREZ	
Nº 2335	



- Colocarse **guantes** desechables (o domésticos en caso de no tener desechables) y mascarilla antes de comenzar a manipular la muestra.
- En caso de disponer de mecheros de gas o de alcohol, abrir el envase que contiene la muestra por detrás de la llama del mechero, para protegerse de posibles aerosoles (la llama debe quedar entre el envase y la persona que está manipulando la muestra).
- Con la ayuda de una varilla o palillo de madera, tomar la muestra desde el envase. Las **partes más purulentas y densas** del esputo son las que deben utilizarse, ya que son las que con mayor probabilidad contendrán bacterias.





- Para tomar la muestra con mayor facilidad se puede partir uno de los extremos de la varilla y tomar el esputo con esta parte astillada o quebrada. Para cada muestra se empleará **siempre una varilla o palillo diferente**, para no producir contaminaciones cruzadas entre las muestras.
- Extender la muestra sobre la parte central del portaobjetos, teniendo cuidado de que **no resulte una extensión demasiado densa** o demasiado fina, lo que dificultaría la visualización y, por tanto, el diagnóstico.
- Repetir el proceso para cada una de las muestras a estudiar.
- Dejar secar las preparaciones a temperatura ambiente (**hasta que no se encuentren completamente secas no se podrán teñir**). Una vez que estén completamente secas podrán ser teñidas para su análisis en el microscopio como se explica en el siguiente punto.
- Las varillas y resto del material desechable que se haya empleado durante el proceso, se debe tirar en un contenedor o frasco que contenga fenol al 5% o hipoclorito de sodio al 1%. Si se han utilizado guantes domésticos, una vez terminada la preparación de todas las muestras sumergir las manos enguantadas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% para desinfectarlos antes de quitárselos.
- Limpiar (desinfectar) la superficie de trabajo con papel empapado en hipoclorito de sodio al 1% o fenol al 5%. En caso de haber cubierto la superficie, desechar el material.

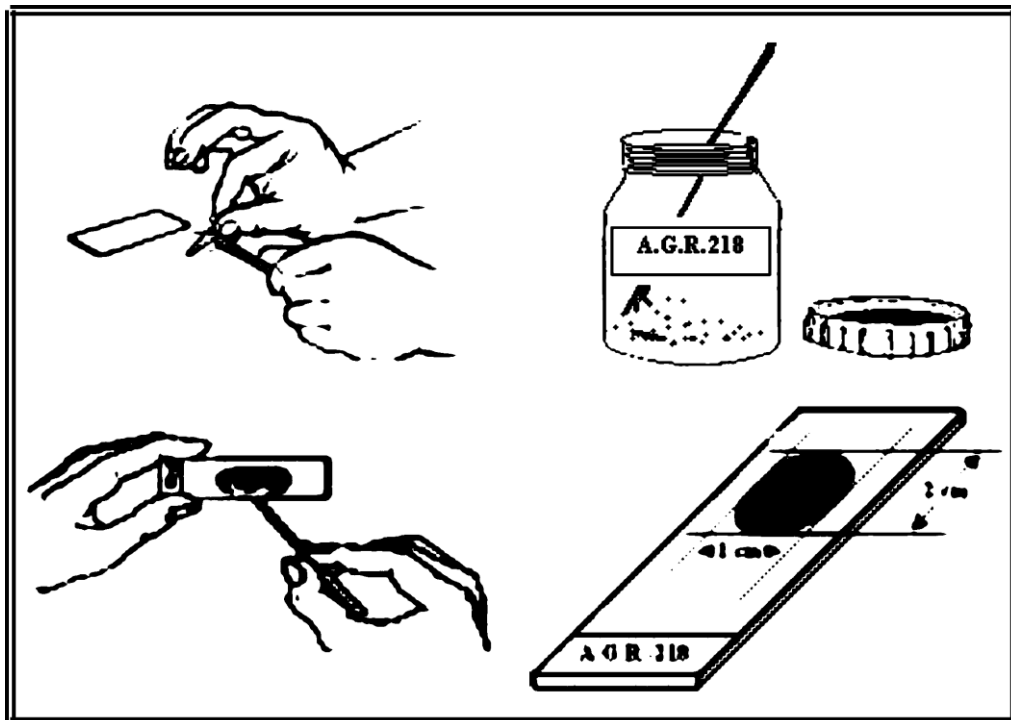


Figura 1: Extensión de la muestra de esputo sobre el portaobjetos.

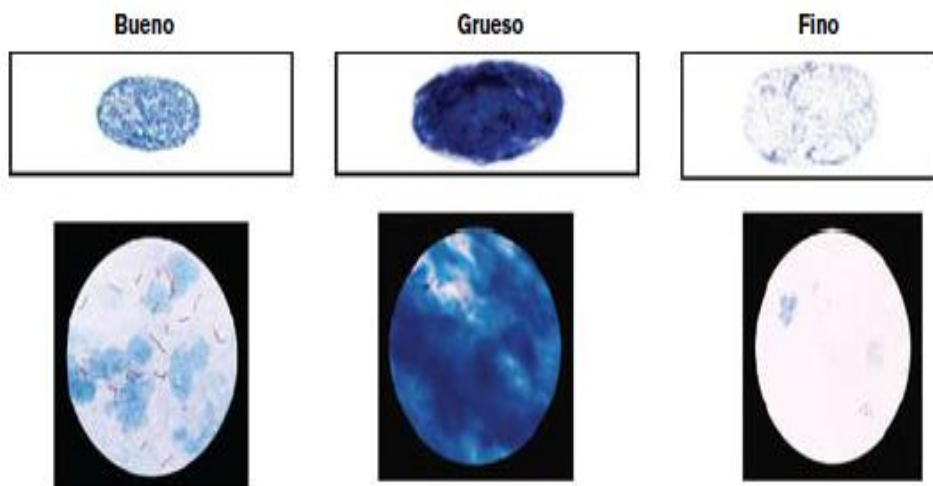
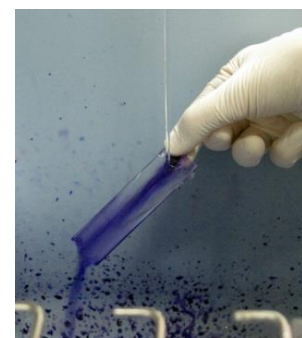
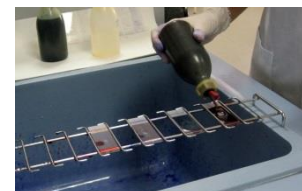


Figura 2: Grosor adecuado de las extensiones para su visualización microscópica.

TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN

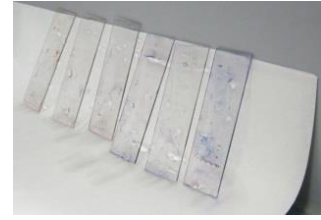
Los bacilos tuberculosos resisten la decoloración con alcohol – ácido (bacilos ácido-alcohol resistentes o BAAR), por lo que las tinciones ácido-alcohol resistentes (como es la tinción de Ziehl-Neelsen) son las adecuadas para su visualización microscópica. Los diferentes pasos para realizarla son los siguientes:

1. Una vez que las muestras de esputo están secas, deben fijarse pasándolas 2 o 3 veces por encima de la llama de un mechero, con cuidado de no calentarlas demasiado.
2. Colocar las preparaciones en las varillas de metal sobre las que se vayan a realizar la tinción.
3. Evitar que caiga agua del grifo sobre la preparación.
5. Cubrir la preparación con el reactivo **FUCSINA FENICADA**.
6. Calentar hasta que emita vapores pero sin dejar que el colorante hierva (**evitar que haga burbujas**).
7. Dejar enfriar unos segundos y repetir otras 2 veces el calentamiento.
8. Lavar con **AGUA**.
9. Decolorar con alcohol-ácido (**ALCOHOL CLORHÍDRICO AL 3%**) hasta que la preparación quede totalmente decolorada (los microorganismos AAR, no se decoloran, permaneciendo de color rojo-fucsia).
10. Lavar con **AGUA**.
11. Cubrir la preparación con el reactivo **AZUL DE METILENO** durante 30 segundos (tanto el fondo de la preparación como los microorganismos no AAR quedan teñidos de azul).





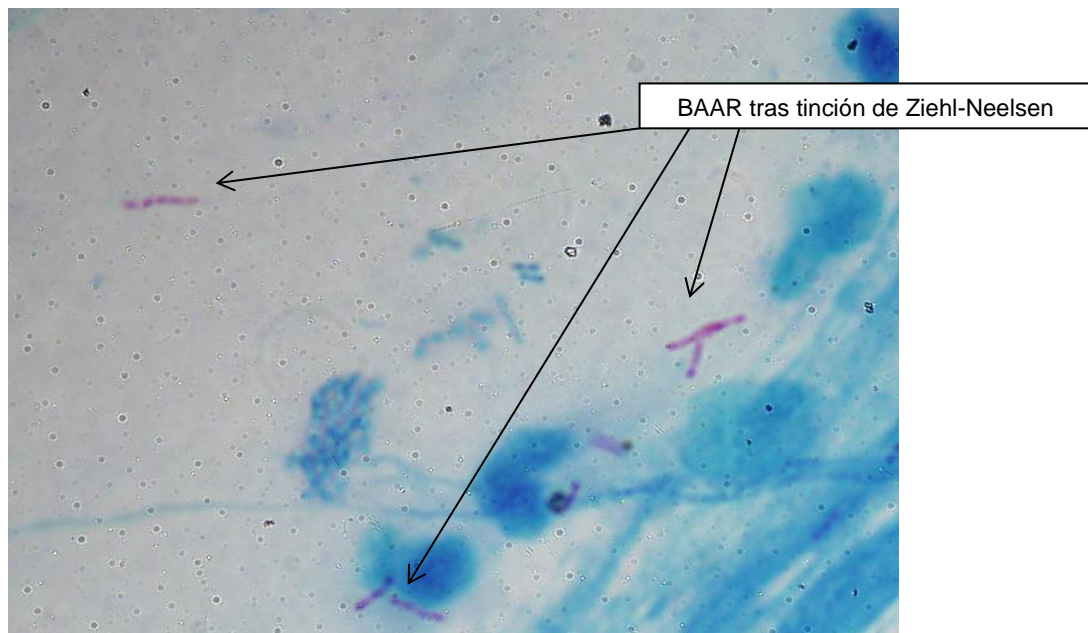
12. Lavar con **AGUA**.
13. Dejar secar la preparación en posición vertical y visualizar en el microscopio con el objetivo 100x (aceite de inmersión).



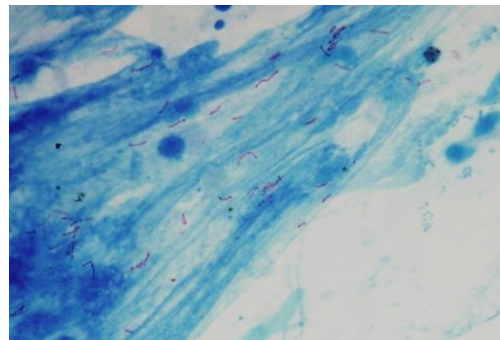


OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO

- Las preparaciones se observarán al microscopio mediante el objetivo 100X y con aceite de inmersión.
- Los bacilos tuberculosos se observan como **filamentos** o bastones finos, ligeramente curvados de **color fucsia sobre fondo azul**.



- Para no repetir campos microscópicos, se deben **recorrer** las preparaciones en líneas rectas (de izquierda a derecha o de arriba abajo, por ejemplo).
- Para saber si la muestra de esputo es válida (corresponde a una muestra del tracto respiratorio inferior) se debe observar la presencia de **leucocitos polimorfonucleares (PMN) y células epiteliales**. Se considera que la muestra es adecuada para el diagnóstico si presenta más de 25 PMN y menos de 10 células epiteliales por campo de 100 aumentos.
- Se deben examinar sistemáticamente **100 campos** microscópicos y contar el nº de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) identificados en cada uno. Para que resulte más sencillo, puede utilizarse una cuadrícula tal y como se muestra a continuación. En cada cuadro de la misma se anotará el nº de BAAR observados en cada campo microscópico. Para calcular el promedio se sumarán el nº de BAAR encontrados en cada campo y esta cifra se dividirá entre el nº de campos observados (en este caso 100):



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

- El resultado final de la baciloscopia se informará tal y como se describe aquí:

297.e10

J. González-Martín et al / *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;**28(5)**:297.e1-297.e20

Tabla 5

Interpretación de los resultados de la baciloscopia

Informe	Ziehl-Neelsen (× 1.000)	Tinción fluorescente (× 250)	Tinción fluorescente (× 450)
Negativo	0	0	0
Dudoso (repetir)	1-2/300 campos (3 barridos)	1-2/30 campos (1 barrido)	1-2/70 campos (1,5 barridos)
Positivo 1+	1-9/100 campos (1 barrido)	1-9/10 campos	2-18/50 campos (1 barrido)
Positivo 2+	1-9/10 campos	1-9/campo	4-36/10 campos
Positivo 3+	1-9/campo	10-90/campo	4-36/campo
Positivo 4+	> 9/campo	> 90/campo	> 36/campo

Modificado de Alcaide et al³².

Interpretación de los resultados de la baciloscopia.

- Una vez terminada la lectura de cada muestra, se limpiará el objetivo con un trozo de papel absorbente y se anotará el resultado en el libro de registro.



FUENTES FIGURAS

- **Figura 1:** Modificado de Manual de técnicas de laboratorio para el examen baciloscópico. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. 2003.
- **Figura 2:** Tomado de Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Organización Panamericana de la Salud. 2008.