



**Kit de frotis BAAR *F.A.S.T.*[™] con solución
de digestión (recuento de 400)**

Manual de instrucciones

Form 432 Rev. B
Revisado el 18.1.2012

Kit de frotis BAAR F.A.S.T.™ con solución de digestión (recuento de 400)

Uso previsto

Para su uso en la digestión/descontaminación y la preparación de cultivos o muestras respiratorias de pacientes para la posterior detección o caracterización de organismos ácido-alcohol resistentes.

Resumen y principios

La incidencia mundial de la tuberculosis ha experimentado una tendencia creciente al menos desde 1990, momento en el que la Organización Mundial de la Salud comenzó a registrar los datos de su incidencia.¹ La detección temprana y precisa de la tuberculosis (TB) es esencial tanto para un control efectivo como para el tratamiento de la enfermedad. El método más habitual para la detección de la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* es el uso de la microscopía de frotis del esputo,¹ que ofrece tanto un diagnóstico presuntivo inicial como un recuento de la carga micobacteriana.

Los organismos ácido-alcohol resistentes como, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, pueden teñirse con tintes de anilina y son resistentes a la decoloración por la acción del ácido o del alcohol. Si a continuación se realiza una tinción de contraste, este tratamiento permite que los organismos ácido-alcohol resistentes mantengan el tinte, mientras que el resto de organismos y de residuos retendrán la tinción de contraste. Sin embargo, los métodos de tinción que se suelen utilizar para la microscopía ácido-alcohol producen un frotis que puede ser difícil de analizar y puede requerir mucho tiempo. Los tintes Auramina O y auramina-rodamina se han utilizado con éxito en la microscopía basada en fluorescencia de micobacterias. Los informes sobre los mecanismos de la tinción son contradictorios. Estos incluyen la unión de la Auramina O a la pared celular de las micobacterias,² así como la unión de "prácticamente todo" el tinte a los ácidos nucleicos de las micobacterias.³ Sin embargo, se ha demostrado que los métodos de tinción basados en Auramina O son más sensibles que los de microscopía ligera para la detección de organismos ácido-alcohol resistentes (BAAR).⁴ Este incremento en la sensibilidad se debe, en gran parte, al considerable contraste que los tintes fluorescentes confieren a los organismos ácido-alcohol resistentes, que muestran un color verde sobre un fondo oscuro. Este incremento en la distinción permite el uso de objetivos con mayor campo visual, lo que permite reducir el tiempo de examen total.

El método de referencia para diagnosticar la TB es el cultivo y, a menudo, se lleva a cabo junto con una microscopía de frotis o tras la detección de una muestra positiva de frotis. La preparación de una muestra de esputo para un cultivo requiere tanto la reducción de la viscosidad de la muestra mediante digestión como la descontaminación mediante la disminución de los niveles de flora común viable. A menudo, para la digestión y la descontaminación, se emplea el método NALC-NaOH. Aquí la NALC (N-Acetil-L-Cisteína) actúa como un agente mucolítico al crear las asociaciones entre las moléculas de mucosa individuales. El NaOH (hidróxido de sodio) inactivará la flora común y los organismos ácido-alcohol resistentes, pero con una exposición controlada (tiempo y concentración) puede matar la flora y dejar viables los organismos ácido-alcohol resistentes. Tras la digestión, la descontaminación y la posterior concentración, la muestra resultante se puede utilizar para microscopías de cultivo y de frotis.

El kit de frotis BAAR F.A.S.T. de QBC con solución de digestión incluye reactivos y elementos desechables necesarios para llevar a cabo una microscopía de fluorescencia de frotis de TB, incluida la descontaminación y la digestión de muestras. Los componentes están especialmente diseñados para funcionar como un sistema completo e incluyen el innovador kit de tinción Auramina O F.A.S.T. que ahorra trabajo y los portaobjetos para microscopio SureFocus (patente pendiente). El kit de tinción Auramina O F.A.S.T. utiliza un rápido proceso de cuatro pasos que solo requiere dos minutos, en comparación con los métodos de auramina convencionales que necesitan aproximadamente entre 15 y 20 minutos. Los portaobjetos para microscopio SureFocus simplifican la microscopía de fluorescencia al proporcionar marcas fluorescentes en toda el área del frotis para encontrar y mantener el enfoque. Esto ayuda a reducir la fatiga y la tensión

del operador y a garantizar la calidad de los resultados.

Componentes del kit

El contenido de este kit es suficiente para procesar aproximadamente 400 muestras e incluye los siguientes elementos:

400	tubos estériles para la preparación del esputo
1200	pipetas de transferencia estériles
432	portaobjetos para microscopio SureFocus
120 ml	de tinte Auramina O <i>F.A.S.T.</i> de QBC
120 ml	de decolorante/agente de apagamiento <i>F.A.S.T.</i> de QBC
5	portaobjetos de control de calidad <i>F.A.S.T.</i>
9	soluciones de digestión de esputo (75 ml)
4	paquetes de tampón de digestión
1	prospecto de producto del kit

Advertencias y precauciones

Para aplicaciones de diagnóstico *in vitro*

Las muestras clínicas humanas pueden albergar enfermedades infecciosas, tales como los agentes causantes de la hepatitis, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), etc. Durante el manejo de las muestras clínicas, debe seguir las precauciones universales y las normas y recomendaciones locales. Cualquier actividad que pueda generar aerosoles a partir de muestras clínicas debe llevarse a cabo en una cabina de bioseguridad. Las actividades relacionadas con el cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* deben llevarse a cabo siguiendo los procedimientos y prácticas de bioseguridad de nivel 3.

Las sustancias químicas incluidas en este kit son peligrosas y pueden causar lesiones o incluso la muerte. Los reactivos contienen un potente álcali y pueden causar quemaduras. Evite el contacto con los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuáguelos inmediatamente con una abundante cantidad de agua. En caso de ingestión de la solución de digestión de esputo, tome leche, clara de huevo o grandes cantidades de agua. En caso de contacto con los ojos o de ingestión, póngase en contacto con un médico inmediatamente. Consulte la hoja de datos sobre seguridad de materiales del kit para disponer de información adicional sobre seguridad y sobre cómo desechar estas sustancias adecuadamente.

La microscopía de frotis del esputo y los procedimientos relacionados con la preparación de la muestra y su procesado solo deben llevarse a cabo por personal con formación en las técnicas utilizadas, así como en las prácticas y procedimientos de laboratorio generales.

Instrucciones de uso

Para su uso con muestras respiratorias de pacientes.

Los tubos de preparación de esputo, las pipetas de transferencia estériles y los portaobjetos SureFocus son de un solo uso.

Preparación del tampón fosfato

1. Vierta el contenido del paquete de polvo de tampón fosfato en un matraz aforado de 500 ml o en un matraz autoclavable de 500 ml.
2. Añada 500 ml de agua y mezcle bien.
3. Si ha utilizado un matraz aforado, vierta los contenidos en un matraz autoclavable.
4. Introduzca el tampón en un autoclave.

Procedimiento de digestión

1. Antes de utilizarla, afloje el tapón de la botella de plástico con la solución de digestión de esputo (pero no lo retire).
2. Coloque la ampolla en la botella y apriétela en posición vertical hasta que la ampolla se rompa.
3. Cierre el tapón y agite la botella suavemente para disolver la NALC. Evite la formación de espuma en la solución.
4. En un tubo de centrifuga estéril de 50 ml y sin aerosoles, añada cantidades iguales de la muestra

clínica y de la solución con NALC.

5. Tape el tubo de centrífuga y mezcle la muestra hasta que se haya licuado. Permita que la reacción de digestión se lleve a cabo. Esta requiere 15 minutos a temperatura ambiente. No permita procesos de digestión de mayor duración, ya que la exposición prolongada a la solución de digestión desactivará las micobacterias.
6. Añada el tampón fosfato estéril hasta conseguir un volumen final de 50 ml y tape de nuevo el tubo de centrífuga.
7. Centrifugue la muestra durante 15 minutos a una velocidad de entre 2.200 y 3.000 x g.
8. Decante el sobrenadante en un contenedor para desechos de peligro biológico adecuado.
9. Suspenda de nuevo el sedimento en 1 o 2 ml de tampón fosfato. En este momento, el pH de la muestra debería ser de 6,8.
10. La muestra está lista para el análisis diagnóstico y el cultivo.

Preparación del frotis y tinción:

Sitúe la muestra en la parte central del portaobjetos SureFocus y distribúyala para crear un frotis uniforme de forma que cubra toda la superficie de la elipse. El frotis debe ser lo suficientemente grueso como para garantizar que se ha incluido una muestra adecuada. Sin embargo, las líneas del portaobjetos SureFocus deben ser visibles a través de la muestra. Fije por calor el portaobjetos utilizando un mechero o un calentador de portaobjetos.

1. Fije por calor el portaobjetos con el frotis con la muestra.
2. Cubra el frotis con el tinte Auramina O *F.A.S.T.* y deje reposar durante 1 minuto
3. Aclare el frotis cuidadosamente con agua desionizada o con agua del grifo y escurra
4. Cubra el frotis con el decolorante/agente de apagamiento *F.A.S.T.* y deje reposar durante 1 minuto
5. Aclare el frotis cuidadosamente con agua desionizada o con agua del grifo, escurra y seque el portaobjetos
6. Examine el portaobjetos utilizando el ParaLens de QBC o un aparato de microscopía de fluorescencia equivalente

Procedimiento de examen:

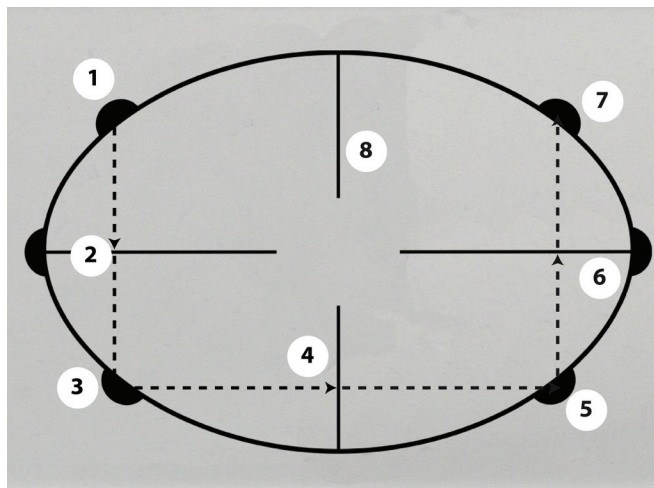
Examine el portaobjetos con el ParaLens de QBC o con un aparato de microscopía de fluorescencia equivalente. A continuación, tiña el portaobjetos fijado por calor utilizando un procedimiento de tinción con Auramina O como, por ejemplo, Auramina O *F.A.S.T.* Nota: se recomienda incluir una muestra de control positiva y negativa en cada lote de muestras teñidas para comprobar la integridad de los instrumentos y de los reactivos, así como el rendimiento de los técnicos.

Examen del frotis:

Coloque el portaobjetos teñido en la platina del microscopio y centre el objetivo sobre un círculo de inicio. Utilizando un modo de iluminación de campo, enfoque el círculo de inicio usando un objetivo de baja potencia y vaya aumentando hasta conseguir el objetivo para el examen del frotis deseado. Cambie al modo de fluorescencia. De forma alternativa, el microscopio puede enfocarse en el modo de fluorescencia siguiendo el procedimiento que se indica a continuación: centre el objetivo sobre el círculo de inicio y ajuste la altura de la platina a la distancia de trabajo del objetivo. Con la luz fluorescente conectada, mire a través del visor y enfoque utilizando el enfoque fino hasta que el campo esté enfocado. (Truco: a medida que la línea fluorescente entre en enfoque, el campo visual deberá mostrar un color verde brillante. Si el campo permanece oscuro, habrá superado el plano focal correcto). Muévase hacia el borde de la línea fluorescente y ajuste de nuevo el enfoque.

Comience a examinar el frotis en el círculo de inicio y pase a la siguiente marca. Las marcas pueden utilizarse a modo de indicadores para el número de campos visuales examinados si estos se observan de forma secuencial, sin pasar a diferentes ubicaciones dentro del frotis (por ejemplo, si el movimiento de la platina es continuo). Al alcanzar la siguiente marca, asegúrese de que el campo esté enfocado. Continúe el examen pasando de marca a marca hasta recorrer el número de campos correspondiente (o la distancia recorrida si el movimiento ha sido continuo) según indiquen sus procedimientos operativos estándar. Comunique los resultados.

Figura 1



La Figura 1 muestra un portaobjetos SureFocus con una ruta de examen sugerida. Para esta ruta, obtenga el enfoque inicial utilizando el círculo de inicio 1. Examine el portaobjetos en sentido vertical y de forma sistemática, moviéndose a lo largo del círculo de inicio 3. Cuando se mueva de un campo de visión a otro, proceda a un examen con un movimiento continuo, teniendo cuidado de no saltar entre campos. Una vez alcance la línea 2, asegúrese de que el microscopio esté enfocado. Continúe en sentido vertical al círculo de inicio 3 y asegúrese de que el microscopio esté enfocado. Siga en sentido horizontal a lo largo de la línea 4. Al llegar a esta, asegúrese de que el campo esté enfocado. Llegados a este punto, habrá examinado el siguiente número de campos si ha analizado los campos visuales con un movimiento continuo:

Ampliación	Número de campos examinados
200x	26
400x	52
600x	78
1000x	130

La siguiente tabla incluye las distancias y los campos visuales aproximados con diferentes ampliaciones estándar entre marcas:

Ruta de examen	Distancia (mm)	Campos visuales		
		200x	400x	600x
1 a 2; 2 a 3; 5 a 6; 6 a 7	6,5	7	14	21
1 a 8; 8 a 7; 3 a 4; 4 a 5	11	12	24	36

Procedimiento de control de calidad:

Los portaobjetos deben teñirse con reactivos utilizados para el diagnóstico de muestras de pacientes. El técnico que lleve a cabo la tinción de la muestra del paciente debe llevar a cabo la tinción del portaobjetos de control utilizando procedimientos de tinción de muestras. Los frotis, tanto positivos como negativos, deben ser examinados por técnicos de laboratorio que lleven a cabo el diagnóstico de muestras de pacientes. El control de calidad debe llevarse a cabo de forma habitual y siguiendo la normativa gubernamental. Los resultados deben recogerse por escrito.

1. Tiña el portaobjetos de control de calidad *F.A.S.T.* de QBC y el portaobjetos de control utilizando el kit de tinción Auramina O *F.A.S.T.* y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.
2. Mantenga los portaobjetos separados durante el procedimiento de tinción con el fin de evitar la contaminación cruzada que pueda producirse entre los reactivos de tinción de cada portaobjetos.

3. Examine el portaobjetos teñido con un microscopio adecuado para el tipo de tinción y anote los resultados.

Resultados esperados

La solución de digestión de esputo *F.A.S.T.* de QBC se utiliza para la digestión y descontaminación de muestras clínicas de origen respiratorio (esputo o lavado bronquial) en las que se sospecha la presencia de micobacterias.

Si los procedimientos se siguen correctamente, las muestras viscosas se licuarán y la contaminación de la flora normal se reducirá o eliminará.

Cuando se realiza un examen con un microscopio de fluorescencia con un filtro de emisión verde y un filtro de excitación azul (por ejemplo, filtro de excitación: 435 - 480 nm; filtro de emisión: 510 - 600 nm), las marcas del portaobjetos SureFocus deben brillar en color verde y sirven de guía para el enfoque. Al estar enfocadas, las micobacterias, al igual que las del control positivo y que otros organismos ácido-alcohol resistentes, deberían brillar con color verde fluorescente sobre un fondo oscuro. El resto de organismos, al igual que los del control negativo, deberían mostrar las características de la tinción de fondo. Un bacilo fluorescente sirve como presunta identificación de una especie *Mycobacterium*.

Las micobacterias en el hueco positivo del portaobjetos del control de calidad deben brillar con un color verde brillante. El control negativo debería mostrar las características de la tinción de fondo.

Si no se obtienen los resultados esperados, investigue la causa, que puede ser un fallo de los reactivos, de los instrumentos o de los operadores humanos. Si se sospecha un fallo de control, utilice otro medio para comprobar el sistema como, por ejemplo, una muestra del paciente (que se sepa que es positiva o negativa). No informe al paciente sobre los resultados hasta que se haya corregido el fallo del sistema.

Limitaciones

Los tubos para la preparación del esputo y las pipetas de transferencia estériles se proporcionan estériles. Si el envase primario está dañado o abierto, no utilice el producto.

Ningún método de digestión/descontaminación es adecuado para todas las muestras clínicas y para todas las situaciones. Seleccione el procedimiento menos agresivo para reducir la contaminación.

Existen algunos tipos de micobacterias de rápido crecimiento que podrían no mostrar fluorescencia con esta tinción. En este tipo de muestras, deben utilizarse otros métodos como el Ziehl-Neelsen o el Kinyoun. La fluorescencia de los frotis puede desvanecerse a lo largo del tiempo y puede degradarse debido a unas condiciones de calor o de luz excesivas. Por ese motivo, las muestras teñidas deben examinarse lo más pronto posible.

Si la señal fluorescente no se aprecia en las líneas de los portaobjetos SureFocus, no utilice los portaobjetos para la microscopía de fluorescencia.

Aunque un resultado positivo indica la presencia de micobacterias, un resultado negativo no descarta la infección. Para obtener una identificación positiva, deben utilizarse otros métodos de diagnóstico, como un cultivo o una PCR.

Si los portaobjetos SureFocus o los de control de calidad muestran poca o ninguna fluorescencia, compruebe que el sistema de microscopía de fluorescencia funciona adecuadamente. Investigue la causa, que puede ser un fallo de los reactivos, de los instrumentos o de los operadores humanos. Si se sospecha un fallo de control, utilice otro medio para comprobar el sistema como, por ejemplo, una muestra del paciente (que se sepa que es positiva o negativa). No informe al paciente sobre los resultados hasta que se haya corregido el fallo del sistema.

Materiales necesarios no incluidos

El kit de tinción de frotis BAAR *F.A.S.T.* de QBC con solución de digestión está diseñado para trabajar con un sistema de microscopía de fluorescencia capaz de excitar las muestras entre 425 y 480 nm y de transmitir una fluorescencia de entre 510 y 600 nm. Los equipos adicionales necesarios incluyen los siguientes elementos:

- Calentador de portaobjetos o mechero de llama
- Centrífuga capaz de girar tubos de preparación de esputo a 2.200 y 3.000 x g

- Cabina de seguridad para la manipulación de muestras
- Equipo de protección personal

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud. Control mundial de la tuberculosis (2009): epidemiología, estrategia y financiación: Informe OMS 2009. Ediciones de la OMS, Ginebra, Suiza.
2. Baron, E.J. y S.M. Finegold. (1990) *Baily & Scott's Diagnostic Microbiology*, 8ª edición. The CV Mosby Company, Baltimore, Maryland.
3. Hanscheid, T. (2008) The future looks bright: low-cost fluorescencnt microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.
4. Steingart K. R., *et al.* (2007) Fluorescence versus conventional for sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Disease* 6:570-81.
5. *Essential Procedures for Clinical Microbiology*. (1998) American Society of Microbiology. Washington, D.C.

Información para pedidos

Kit de frotis para TB <i>F.A.S.T.</i> de QBC con solución de digestión	427408
Centrífuga <i>F.A.S.T.</i> de QBC (115 V, 60 Hz)	427412
Centrífuga <i>F.A.S.T.</i> de QBC (220 V, 50 Hz)	427413

Número de Catálogo



QBC Diagnostics, Inc.
200 Shadylane Drive, Philipsburg PA, 16866
+1-814-692-7661, www.qbcdiagnostics.com



Emergo Europe
Molenstraat 15, 2513 BH The Hague, Países Bajos
Tel: +31 (0) 70-345-8570, Fax: +31 (0) 70-346-7299



Fabricante



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Utilizado por



Número de catálogo



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Limitación de temperatura



Código de lote



Consulte las instrucciones para su uso



Cáustico



Inflamable



Un solo uso