



Kit de frotis E-Z BAAR F.A.S.T.™

Manual de instrucciones

Form 433 Rev. B
Revisado el 18.1.2012

Kit de frotis E-Z BAAR F.A.S.T.™

Uso previsto

Preparación y tinción de frotis a partir de muestras o cultivos para la detección o caracterización de bacilos ácido-alcohol resistentes como, por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*.

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 bacilos 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 bacilos 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 auraminarodamina 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 bacilos 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 kit de frotis EZ BAAR F.A.S.T. de QBC está diseñado para ser transportado e incluye los reactivos y los elementos desechables necesarios para llevar a cabo una microscopía de fluorescencia de frotis para TB. Los componentes están envasados en 10 unidades compactas. Cada una de ellas contiene reactivos y elementos desechables para 5 análisis e incluyen el innovador kit de tinción Auramina O F.A.S.T. que ahorra trabajo y los portaobjetos para microscopio SureFocus F.A.S.T. (pendiente de patente). El kit de tinción Auramina O 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 y para fijar las distancias a fin de determinar el número de campos visuales examinados. 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 incluye 10 paquetes que son suficientes para procesar aproximadamente 50 muestras. En cada uno de los 10 paquetes se incluyen los siguientes elementos:

- 5 recipientes de recogida de esputo
- 5 aplicadores
- 5 portaobjetos para microscopio SureFocus F.A.S.T.
- 3 ml de tinte Auramina O F.A.S.T. de QBC
- 3 ml de decolorante/agente de apagamiento F.A.S.T. de QBC

Condiciones de almacenamiento

Almacenar a una temperatura de entre 15 y 25 °C. Evite las temperaturas excesivas. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

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. Utilícelas en una zona con la ventilación adecuada y utilizando el equipo de protección personal correspondiente. Mantenga los productos alejados de llamas expuestas. 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.

Este producto está diseñado para contribuir a la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes. La microscopía de frotis del esputo y los procedimientos relacionados con la preparación de la muestra y su procesado para la detección BAAR solo deben llevarse a cabo por personal con formación en las técnicas utilizadas, así como en las prácticas y procedimientos de laboratorio generales.

Precaución: este producto contiene portaobjetos de cristal. Manéjelo con precaución.

Instrucciones de uso

Para su uso con muestras cultivadas o esputo concentrado o directo.

Los recipientes de recogida de esputo, los aplicadores y los portaobjetos SureFocus™ son de un solo uso

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. Para frotis directos, 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.

Procedimiento de tinción:

1. Fije por calor el frotis con el esputo
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 y escurra
6. Seque el portaobjetos

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:

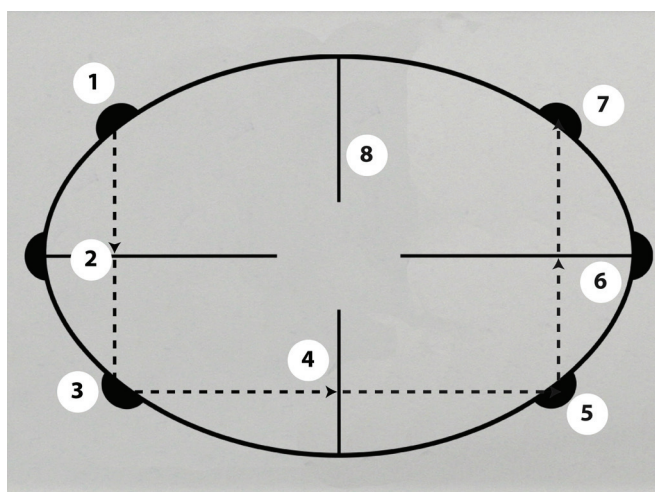
Coloque el portaobjetos tejido en la platina del microscopio y centre el objetivo sobre un círculo de inicio. Utilizando un modo de iluminación de campo, enfoque el círculo de inicio usando un objetivo de baja potencia y vaya aumentando hasta conseguir el objetivo para el examen del frotis deseado. Cambie 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.

Ejemplo de examen del frotis:

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 examen 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.

Si el control de calidad positivo no muestra fluorescencia, esto puede indicar la degradación de los reactivos de tinción. No utilice estos reactivos en muestras de pacientes hasta que haya resuelto el problema.

Resultados esperados

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 bacilos 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 deberá 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

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.

Los reactivos de tinción *F.A.S.T.* pueden degradarse cuando se exponen a una cantidad de calor excesiva. Lleve a cabo siempre un control de calidad para comprobar la integridad de la tinción antes de informar a los pacientes de los resultados. No utilice la tinción si el control de calidad falla.

Materiales necesarios no incluidos

El kit de tinción de frotis BAAR *F.A.S.T.* de QBC 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 incluyen un calentador de portaobjetos o un mechero de llama (por ejemplo, un mechero Bunsen o una lámpara de alcohol).

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. Steingart K. R., et al. (2007) Fluorescence versus conventional for sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infectious Disease* 6:570-81.
4. Hanscheid, T. (2008) The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.

Para obtener información sobre cómo realizar un pedido de los kits y accesorios BAAR *F.A.S.T.*, consulte nuestra página web www.qbcdiagnostics.com. El personal de ventas de QBC también se encuentra disponible en el teléfono +1 (814) 692-7661 (para EE. UU.) y a través de la dirección de correo electrónico qbcsales@qbcdiag.com.

Información para pedidos

Kit de frotis BAAR *F.A.S.T.* de QBC

Número de Catálogo

427410



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