

TB Stain Kit K		1	N.º ref. 212522
TB Carbofuchsin KF	Para la tinción de micobacterias por el	1 x 250 mL	
TB Decolorizer	procedimiento de ácido-resistencia de	1 x 250 mL	
TB Brilliant Green K	Kinyoun (en frío).	1 x 250 mL	
TB Stain Kit ZN		1	212520
TB Carbofuchsin ZN	Para la tinción de micobacterias por el	1 x 250 mL	
TB Decolorizer	procedimiento de ácido-resistencia de	1 x 250 mL	
TB Methylene Blue	Ziehl-Neelsen (en caliente).	1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit M		1	212519
TB Auramine M	Para la tinción de micobacterias por el	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM	procedimiento de fluorescencia de Morse,	1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate	Blair, Weiser y Sproat.	1 x 250 mL	
TB Fluorescent Stain Kit T		1	212521
TB Auramine-Rhodamine T	Para la tinción de micobacterias por el	1 x 250 mL	
TB Decolorizer TM	procedimiento de fluorescencia de Truant,	1 x 250 mL	
TB Potassium Permanganate	Brett y Thomas.	1 x 250 mL	
TB Auramine M	Para la tinción de micobacterias por el	4 x 250 mL	212514
	procedimiento de fluorescencia de Morse,		
	Blair, Weiser y Sproat.		
TB Auramine-Rhodamine T	Para la tinción de micobacterias por el	4 x 250 mL	212515
	procedimiento de fluorescencia de Truant,		
	Brett y Thomas.		
TB Brilliant Green K	Para la tinción de micobacterias por los	4 x 250 mL	212523
	procedimientos de ácido-resistencia de		
	Kinyoun (en frío) y de Ziehl-Neelsen		
	(en caliente).		
TB Carbofuchsin KF	Para la tinción de micobacterias por el	4 x 250 mL	212518
	procedimiento de ácido-resistencia de		
	Kinyoun (en frío).		
TB Carbofuchsin ZN	Para la tinción de micobacterias por el	4 x 250 mL	212511
	procedimiento de ácido-resistencia de		
	Ziehl-Neelsen (en caliente).		
TB Decolorizer	Para la tinción de micobacterias por los	4 x 250 mL	212517
	procedimientos de ácido-resistencia de		
	Kinyoun (en frío) y de Ziehl-Neelsen		
	(en caliente).		
TB Decolorizer TM	Para la tinción de micobacterias por los	4 x 250 mL	212512
	procedimientos de fluorescencia de Truant,		
	Brett y Thomas y de Morse, Blair,		
	Weiser y Sproat.		
TB Methylene Blue	Para la tinción de micobacterias por los	4 x 250 mL	212516
	procedimientos de ácido-resistencia de		
	Kinyoun (en frío) y de Ziehl-Neelsen		
	(en caliente).		
TB Potassium Permanganate	Para la tinción de micobacterias por los	4 x 250 mL	212513
	procedimientos de fluorescencia de Truant,		
	Brett y Thomas y de Morse, Blair,		
	Weiser y Sproat.		

USO PREVISTO

Los kits de tinción TB se utilizan para teñir frotis preparados a partir de muestras y cultivos que se sospecha que contienen micobacterias, para el diagnóstico de sospecha precoz de infección micobacteriana y la caracterización de aislados bacterianos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La técnica de tinción microscópica es uno de los métodos más precoces diseñados para detectar el bacilo tuberculoso, y continúa siendo un procedimiento estándar¹. La característica exclusiva de ácido-resistencia de las micobacterias hace que la técnica de tinción sea útil en el diagnóstico de sospecha precoz así como para proporcionar información sobre el número de bacilos ácido-resistentes presentes.

La microscopía fluorescente ofrece numerosas ventajas sobre los métodos clásicos para la detección de micobacterias debido a su velocidad y sencillez, a la facilidad para examinar el portaobjeto y a la fiabilidad y la superioridad del método.²

El kit TB Stain Kit K utiliza el procedimiento de ácido-resistencia de Kinyoun (en frío).³

El kit TB Stain Kit ZN utiliza el procedimiento de ácido-resistencia de Ziehl-Neelsen (en caliente).⁴

El kit TB Fluorescent Stain Kit M utiliza el procedimiento de fluorescencia y ácido-resistencia de la auramina o.⁵

El kit TB Fluorescent Stain Kit T utiliza el procedimiento de fluorescencia y ácido-resistencia de auramina-rodamina descrito por Truant, Brett and Thomas.⁶

FUNDAMENTO DEL PROCEDIMIENTO

Una característica esencial de las micobacterias es que son "ácido-resistentes", es decir, que una vez teñidas con el colorante de anilina, fucsina básica, son difíciles de decolorar y conservan el color rojo aunque sean tratadas con una mezcla de ácido y alcohol.

En la tinción de Ziehl-Neelsen, el contracolorante es azul de metileno. En la tinción de Kinyoun, el verde brillante proporciona el contraste necesario.

Los colorantes fluorescentes poseen la propiedad de emitir radiación visible cuando son estimulados por la luz ultravioleta de longitud de onda más corta, como una lámpara de vapor de mercurio o una fuente de luz azul intensa debidamente filtrada.⁷

La auramina O y la rodamina B se unen a los ácidos micólicos de la pared celular micobacteriana.⁸ El colorante libre es eliminado por la solución decolorante ácido-alcohólica. El permanganato potásico actúa como contracolorante para eliminar la fluorescencia de fondo inespecífica.

REACTIVOS

Fórmula aproximada* por litro

TB Stain Kit K

TB Carbofuchsin KF

Fucsina básica	15,0 g
Fenol, USP	45,0 g
Isopropanol	200,0 mL
Etanol	50,0 mL
Agua destilada	750,0 mL

TB Decolorizer

Ácido clorhídrico	30,0 mL
Etanol/Metanol	970,0 mL

TB Brilliant Green K

Verde brillante	2,0 g
Hidróxido de sodio	0,02 g
Agua destilada	1000,0 mL

TB Stain Kit ZN

TB Carbofuchsin ZN

Fucsina básica	1,7 g
Fenol, USP	50,0 g
Isopropanol	95,0 mL
Agua destilada	905,0 mL

TB Decolorizer

Ácido clorhídrico	30,0 mL
Etanol/Metanol	970,0 mL

TB Methylene Blue

Azul de metileno, USP	2,4 g
Etanol/Metanol	300,0 mL
Agua destilada	700,0 mL

TB Fluorescent Stain Kit M

TB Auramine M

Auramina O	2,0 g
Fenol, USP	4,0 g
Glicerina, USP	100,0 mL
Isopropanol	250,0 mL
Agua destilada	650,0 mL

TB Decolorizer TM

Ácido clorhídrico	5,0 mL
Isopropanol	700,0 mL
Agua destilada	300,0 mL

TB Potassium Permanganate

Permanganato potásico	5,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

TB Fluorescent Stain Kit T

TB Auramine-Rhodamine T

Auramina O	12,0 g
Rodamina B	6,0 g
Fenol, USP	80,0 g
Glicerina, USP	600,0 mL
Isopropanol	140,0 mL
Agua destilada	260,0 mL

TB Decolorizer TM

Ácido clorhídrico	5,0 mL
Isopropanol	700,0 mL
Agua destilada	300,0 mL

TB Potassium Permanganate

Permanganato potásico	5,0 g
Agua destilada	1000,0 mL

*Ajustada y/o enriquecida para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales, deben seguirse las "Precauciones estándar"⁹⁻¹² y las directivas del centro.

Se requiere la utilización de prácticas y procedimientos de seguridad biológica de nivel 2 y equipo e instalaciones para contención cuando se manipulen muestras clínicas sin producir aerosoles, como en la preparación de frotis acidorresistentes. Todas las actividades que generen aerosoles deben llevarse a cabo en un gabinete de seguridad biológica de clase I o II. Se requiere la utilización de prácticas de seguridad biológica de nivel 3 y equipo e instalaciones para contención en las actividades de laboratorio que incluyan la propagación y manipulación de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Los estudios en animales también requieren la implementación de procedimientos especiales¹¹.

Estos reactivos son nocivos o mortales en caso de ingestión y pueden causar irritación de los ojos o ceguera. En caso de contacto con los ojos, lávese a conciencia con un sistema de lavado ocular o con agua del grifo durante al menos 15 min y acúdase al médico. La soluciones colorantes y la solución decolorante son muy inflamables y los vapores producidos pueden ser nocivos, por lo que estas soluciones deben utilizarse lejos de llamas abiertas. Evítese el contacto con la piel, los ojos y las mucosas. Todos los reactivos deben utilizarse en un área bien ventilada, evitando una inhalación prolongada, el contacto con la piel y la ingestión.

TB Carbofuchsin ZN: Tóxico en contacto con la piel y por ingestión. Provoca quemaduras. Manténgase el recipiente bien cerrado. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsese indumentaria protectora adecuada.

TB Decolorizer TM: Provoca quemaduras. Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsese indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.

TB Potassium Permanganate: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Manténgase el recipiente bien cerrado. Evítese el contacto con los ojos y la piel. Úsese indumentaria protectora adecuada.

TB Auramine M: Inflamable. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. En caso de contacto con la piel, lávense inmediata y abundantemente con agua. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsese indumentaria protectora adecuada.

TB Auramine-Rhodamine T: Inflamable. Tóxico en contacto con la piel y por ingestión. Provoca quemaduras. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsese indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara. En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.

TB Decolorizer: Nocivo por inhalación y por ingestión. Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsese indumentaria protectora adecuada.

TB Methylene Blue: Nocivo por inhalación y por ingestión. Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.

TB Carbofuchsin KF: Nocivo en contacto con la piel y por ingestión. Irrita los ojos y la piel. Posibilidad de efectos irreversibles. Manténgase el recipiente bien cerrado. Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas — No fumar. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. Úsese indumentaria y guantes de protección adecuados.

Conservación: los reactivos y los kits de tinción TB deben conservarse a una temperatura de 15 a 30 °C. Los reactivos que hayan sido extraídos de los envases de cartón deben conservarse protegidos de la luz. La fecha de caducidad se aplica al producto conservado en su envase intacto de la forma indicada.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Aplique un frotis fino de la muestra directamente sobre un portaobjeto limpio. El esputo (muestra directa o esputo concentrado), el líquido cefalorraquídeo y otros líquidos corporales (orina por sondaje), los tejidos homogeneizados y los portaobjetos de impresión son muestras apropiadas para los frotis.¹

Deje que se seque el frotis.

Fije el frotis al portaobjetos pasando éste a través de una llama baja 2-3 veces, evitando un calor excesivo, o utilice un calentador eléctrico de portaobjetos entre 65 y 75 °C durante 2 h como mínimo¹³.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados*: TB Stain Kit K, TB Stain Kit ZN, TB Quick Stain Kit, TB Fluorescent Stain Kit M, TB Fluorescent Stain Kit T.

**Los diferentes reactivos pueden obtenerse por separado.*

Materiales necesarios pero no suministrados: portaobjetos (nuevos o limpiados en una solución de dicromato ácido), soporte para tinción, papel de filtro y microscopio con lente de inmersión en aceite o microscopio de fluorescencia.

Procedimiento de análisis

TINCIÓN DE KINYOUN

TB Stain Kit K

Instrucciones:

1. Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y sumérjalos en TB Carbofuchsin KF durante 4 min. No los caliente.
2. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
3. Descolórelos con TB Decolorizer durante 3 a 5 s.
4. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
5. Realice una contratinción con TB Brilliant Green K o TB Methylene Blue (disponibles por separado) durante 30 s.
6. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
7. Séquelos al aire. Si utiliza TB Methylene Blue, séquelos con calor suave.

TINCIÓN DE ZIEHL-NEELSEN

TB Stain Kit ZN

Instrucciones:

1. Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y coloque un pedazo de papel de filtro, más grande que la superficie del frotis, sobre cada portaobjetos. Sumérjalos en TB Carbofuchsin ZN. Caliéntelos suavemente hasta la vaporización y déjelos al vapor durante 5 min.
2. Retire el papel de filtro. Lave suavemente los portaobjetos en agua del grifo.
3. Descolórelos con TB Decolorizer con dos cambios de reactivo durante 1 a 2 min hasta que deje de aparecer una coloración roja en el líquido de lavado.
4. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
5. Realice una contratinción con TB Brilliant Green K durante 30 s.
6. Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.

- Séquelos con calor suave.

TINCIÓN DE MORSE

TB Fluorescent Stain Kit M

Instrucciones:

- Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y sumérgalos en TB Auramine M durante 15 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Descolórelos con TB Decolorizer TM durante 30 a 60 s.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Realice una contratinción con TB Potassium Permanganate durante 2 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Séquelos al aire.
- Exáminelos con un microscopio dotado de juegos de filtros, tal como describen Chapin y Murray.¹⁴

TINCIÓN DE TRUANT

TB Fluorescent Stain Kit T

Instrucciones:

- Coloque los portaobjetos en un soporte para tinción y sumérgalos en TB Auramine-Rhodamine T, que debe haber sido agitado a conciencia antes de su uso. Deje reposar los portaobjetos durante 20 a 25 min a temperatura ambiente.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Descolórelos con TB Decolorizer TM durante 2 a 3 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Realice una contratinción con TB Potassium Permanganate durante 4 a 5 min.
- Lave suavemente los portaobjetos con agua del grifo.
- Séquelos ligeramente. Séquelos al aire o muy suavemente sobre una llama.
- Exáminelos con un microscopio dotado de juegos de filtros, tal como describen Truant y cols.⁶ y Chapin y Murray.¹⁴

Control de calidad del usuario: Se recomienda efectuar controles cada día de uso mediante el portaobjetos BBL AFB Slide (Nº de cat. 231391) o con microorganismos acidorresistentes y no acidorresistentes conocidos.

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones pertinentes del CLSI (antes NCCLS) y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Microorganismo	Resultados previstos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Ra ATCC 25177	Positivo
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Negativo

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Una reacción de tinción positiva ofrece evidencia presuntiva de la presencia de micobacterias en la muestra. Una reacción de tinción negativa no indica necesariamente que la muestra sea negativa en cultivo para micobacterias. Para la identificación positiva de micobacterias hay que utilizar otros métodos (de cultivo, moleculares, etc.).

RESULTADOS PREVISTOS Y CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO^{1-8,14}

	Bacilos ácido-resistentes	Bacilos no ácido-resistentes
	TB Stain Kit K	rojo oscuro a rosa
TB Stain Kit ZN	rosa oscuro a rojo	azul
Micobacterias		
TB Fluorescent Stain Kit M	fluorescencia amarilla intensa-verde	
TB Fluorescent Stain Kit T	fluorescencia rojiza-naranja	

BIBLIOGRAFIA: Ver "Referencias" en el texto en inglés.