

BenchMark Special Stains AFB Staining Kit

REF

860-043

08432503001

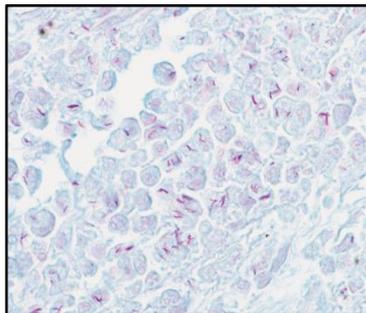
IVD
 75


Figura 1. BenchMark Special Stains AFB Staining Kit en tejido patológico de pulmón.

USO PREVISTO

BenchMark Special Stains AFB Staining Kit está destinado a su uso en laboratorio como tinción histológica cualitativa para detectar la presencia de bacterias acidorresistentes (AFB) mediante microscopía óptica en secciones de tejido fijado con formol y embebido en parafina (FFPE) teñido con un instrumento BenchMark Special Stains.

La interpretación de este producto debe correr a cargo de un anatomopatólogo cualificado junto con un examen histológico, la información clínica pertinente y los controles adecuados. Este producto está destinado para uso diagnóstico in vitro (IVD).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

BenchMark Special Stains AFB Staining Kit es una modificación de la tinción Ziehl-Neelsen.¹ Mediante una solución de fucsina se tiñen de rojo los organismos y los componentes acidorresistentes. La contratinción de Aniline Blue se aplica para producir un fondo azul en contraste.

La propiedad de la acidorresistencia está vinculada a la estructura de la pared celular de las AFB.² Este grupo de bacterias contiene una capa hidrofóbica adicional que está formada por complejos de lípidos, en concreto, de ácido micólico, que se encuentra en torno a la pared celular con peptidoglucano.² Esta capa lipídica cerosa se comporta como barrera selectiva, que permite la permeabilidad de ciertas tinciones fenólicas, como la fucsina, al tiempo que evita la entrada del agente decolorante con ácido-alcohol, convirtiendo estos organismos en acidorresistentes.² En consecuencia, las bacterias acidorresistentes pueden conservar la tinción de fucsina y se tiñen de un color rojo durante la visualización. Los organismos que no son AFB carecen de esta capa adicional de lípidos y permiten la entrada del ácido-alcohol, que decolora la tinción de fucsina. Con la tinción con Aniline Blue, los organismos que no son AFB se tiñen de azul, lo que facilita su distinción de las AFB.

BenchMark Special Stains AFB Staining Kit sirve de ayuda al anatomopatólogo en el diagnóstico de infecciones con bacterias acidorresistentes (AFB).

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

La reacción de tinción se basa en la aplicación de una nueva fucsina con un surfactante y una base de alcohol, que aumenta la tinción y disuelve el colorante, que tiñe todos los componentes del corte. Decolorizer, un reactivo de alcohol ácido, se aplica para eliminar el color de todos los elementos del tejido que no sean componentes acidorresistentes. Los organismos que conservan la tinción contendrían una permeabilidad selectiva a la fucsina.² La contratinción con Aniline Blue facilita un contraste en la sección de tejido para aumentar la visibilidad del organismo.

El kit se ha optimizado para su uso con los instrumentos BenchMark Special Stains. Los reactivos se aplican en el tejido en portaobjetos para microscopio y se mezclan con toda la muestra.

MATERIAL SUMINISTRADO

Los viales de reactivo se suministran en transportadores con etiquetas de código de barras para que puedan introducirse en la bandeja de reactivos del instrumento. Cada kit contiene reactivo suficiente para 75 pruebas:

Un vial de 27 mL de AFB Core Stain contiene 1.75 % de la nueva fucsina y un 2.25 % de surfactante con alcoholtoxilato en alcohol.

Un vial de 27 mL de AFB Core Decolorizer contiene un 64 % de metanol y un 18 % de ácido sulfúrico.

Un vial de 27 mL del reactivo Aniline Blue para AFB contiene, aproximadamente, un 0.015 % de anilino azul y un 0.25 % de ácido acético.

Tres inserciones de viales con cañas de aspiración.

Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

No son necesarias la reconstitución, la mezcla, la dilución ni la titulación de los reactivos del kit. Una mayor dilución de cualquiera de los reactivos puede dar lugar a una tinción no satisfactoria.

Los reactivos del kit se han diluido de forma óptima para su uso con instrumentos BenchMark Special Stains.

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

No todos los productos que aparecen en la hoja de datos están disponibles en todos los lugares. Consulte al representante local de asistencia técnica de Roche.

No se suministran los reactivos y materiales siguientes, pero pueden ser necesarios para la tinción:

1. Tejido de control recomendado
2. Portaobjetos para microscopio con carga positiva
3. Instrumento BenchMark Special Stains
4. BenchMark Special Stains Deparaffinization Solution (10X) (n.º cat. 860-036 / 06523102001)
5. BenchMark Special Stains Liquid Coverslip (n.º de cat. 860-034 / 06523072001)
6. BenchMark Special Stains Wash II (n.º de cat. 860-041 / 08309817001)
7. Equipo de laboratorio de uso general

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

BenchMark Special Stains AFB Staining Kit debe conservarse a una temperatura de entre 15 y 30 °C.

Si se almacenan correctamente, los reactivos se mantendrán estables hasta la fecha indicada en la etiqueta, ya se encuentren abiertos o cerrados.

No utilice el reactivo después de la fecha de caducidad que se indica en el kit.

No existen indicios absolutamente precisos de la inestabilidad de estos reactivos, por tanto, es necesario analizar simultáneamente los controles con las muestras desconocidas. Póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche si el material de control positivo presenta una reducción de la tinción, dado que podría indicar la inestabilidad del reactivo.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos FFPE que se procesan de forma habitual son necesarios para el uso de este ensayo y del instrumento BenchMark Special Stains. El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10 %.³

Lleve a cabo la extracción de las muestras y su conservación conforme a las instrucciones que recoge: «Histotechnology: A Self Instructional Text».⁴ Corte las secciones con el grosor adecuado, de aproximadamente 4 µm, y colóquelas en portaobjetos de vidrio cargados positivamente.

1. Seque los portaobjetos.³
2. Imprima las etiquetas con código de barras correspondientes.
3. Coloque las etiquetas de código de barras en el extremo congelado de los portaobjetos antes de cargarlos en el instrumento (consulte el Manual del usuario del instrumento para obtener información sobre la correcta aplicación de las etiquetas).

Consulte la sección Instrucciones de uso para obtener información sobre el protocolo recomendado para el instrumento BenchMark Special Stains.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro (IVD).
2. Solo para uso profesional.
3. **PRECAUCIÓN:** En Estados Unidos, las normas nacionales restringen la venta de este dispositivo a médicos autorizados o por orden de estos. (Rx Only)
4. No utilizar por encima del número especificado de ensayos.

5. Los portaobjetos con carga positiva pueden verse afectados por presiones ambientales, dando lugar a una tinción incorrecta. Póngase en contacto con su representante de servicio de Roche para obtener más información sobre el uso de este tipo de portaobjetos.
6. Los materiales de origen animal o humano deben manipularse como materiales biopeligrosos para el medio ambiente y eliminarse con las precauciones adecuadas. En caso de exposición, deberán seguirse las directivas sanitarias de las autoridades responsables.^{5,6}
7. Evite el contacto de los reactivos con los ojos y las membranas mucosas. Si los reactivos entran en contacto con zonas sensibles, lávelas con agua abundante.
8. Evite la contaminación microbiana de los reactivos, dado que podría dar lugar a resultados incorrectos.
9. Para obtener más información sobre el uso de este dispositivo, consulte el Manual del usuario del instrumento BenchMark Special Stains y las instrucciones de uso de todos los componentes necesarios, que puede encontrar en navifyportal.roche.com.
10. Consulte a las autoridades locales o nacionales sobre el método de eliminación recomendado.
11. El etiquetado de seguridad de los productos sigue principalmente las directrices del SGA de la UE. Está disponible bajo petición la hoja de datos de seguridad para los usuarios profesionales.
12. Para comunicar la sospecha de incidentes graves relacionados con este dispositivo, póngase en contacto con su representante local de servicio Roche y con las autoridades competentes del Estado o País Miembro de residencia del usuario.

Este producto contiene componentes clasificados como sigue de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1272/2008:

Tabla 1. Información de riesgos.

Riesgo	Código	Declaración
    	H225	El vapor y el líquido son altamente inflamables.
	H301 + H311 + H331	Tóxico cuando se ingiere, si entra en contacto con la piel o si se inhala.
	H314	Puede provocar quemaduras graves en la piel y lesiones oculares.
	H351	Se sospecha que puede causar cáncer.
	H370	Puede ocasionar lesiones en los órganos.
	H412	Perjudicial para los organismos acuáticos con efectos nocivos duraderos.
	P210	Mantener alejado de fuentes de calor, superficies a elevada temperatura, chispas o llamas y otros focos de ignición. No fumar.
	P260	No inhale la niebla o los vapores.
	P280	Lleve guantes y prendas de protección, así como protección auditiva y para el rostro.
	P301 + P310 + P330	SI SE TRAGA: Consulte inmediatamente a un médico o a un centro de toxicología. Enjuáguese la boca.
P303 + P361 + P353	SI ENTRA EN CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quítese de inmediato todas las prendas contaminadas. Enjuague la piel con agua.	
P304 + P340 + P310	SI SE INHALA: Lleve a la persona afectada a respirar aire fresco y procure que respire cómodamente. Consulte inmediatamente a un médico o a un centro de toxicología.	

Riesgo	Código	Declaración
	P305 + P351 + P338 + P310	SI ENTRA EN CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuague los ojos con agua cuidadosamente durante unos minutos. Quítese las lentillas, si las lleva y puede hacerlo con facilidad. Siga aclarando la zona. Consulte inmediatamente a un médico o a un centro de toxicología.
	P308 + P311	Si se sufre una exposición importante: Consulte a un médico o a un centro de toxicología.
	P370 + P378	En caso de incendio: Trate de apagarlo con arena seca, productos químicos secos o espuma resistente al alcohol.
	P403 + P233	Conserve en un lugar con la ventilación adecuada. Conserve siempre el recipiente bien cerrado.

INSTRUCCIONES DE USO

Preparación del vial de reactivo

Antes de utilizarlo por primera vez, es necesario colocar una inserción de vial y la caña de aspiración en el vial del reactivo.

Quite el tapón con el que se suministra el vial y coloque en el vial la inserción y la caña. La inserción y la caña de aspiración deben permanecer en el vial una vez que esté abierto.

Procedimiento de tinción

1. Cargue los reactivos y los portaobjetos en el instrumento.
2. Coloque el tapón blando en la ranura del soporte de reactivo cuando se esté utilizando el reactivo.
3. Lleve a cabo la sesión de tinción según el protocolo recomendado (consulte la Tabla 2) y las instrucciones que recoge el Manual del usuario.
4. Cuando haya finalizado la sesión, retire los portaobjetos del instrumento.
5. Cubra el vial de reactivo con el tapón blando cuando no se utilice.
6. Una vez usados, almacene los reactivos tal y como se recomienda en las condiciones de almacenamiento recomendadas.

Protocolo recomendado

Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y editar según el procedimiento descrito en el Manual del usuario del instrumento.

Los siguientes procedimientos son flexibles para adaptarse a las preferencias del usuario. Este producto se ha optimizado para su uso con el instrumento BenchMark Special Stain, pero es necesario que los usuarios validen los resultados que obtengan con él.

Tabla 2. Protocolo de tinción recomendado para BenchMark Special Stains AFB Staining Kit en un instrumento BenchMark Special Stains.

Procedimiento de tinción	S AFB
Paso del protocolo	Método
Desparafinado	Seleccionar para automatizar la eliminación de la parafina.
Horneado (opcional)	En los valores predeterminados no se encuentra seleccionado. Se recomienda una temperatura de 75 °C durante 4 minutos.
Optimización de la intensidad de la tinción	El tiempo predeterminado es de 16 minutos. Seleccione para permitir el ajuste de la intensidad de la tinción.* Seleccione un tiempo de incubación de entre 12 y 20 minutos: 12 minutos, tinción de AFB más clara con menos tono rosado

Procedimiento de tinción	S AFB
Paso del protocolo	Método
	20 minutos, tinción de AFB más oscura con más tono rosado
Optimización de la intensidad Aniline Blue	El tiempo predeterminado es de 4 minutos. Seleccione para permitir el ajuste de la intensidad de Aniline Blue.* Seleccione un tiempo de incubación de entre 4 y 12 minutos: 4 minutos, contratinción más clara 12 minutos, contratinción más oscura

* Para ajustar las preferencias de la tinción, aumente el parámetro de tiempo de incubación de uno en uno.

Procesamiento post-instrumento recomendado

1. Enjuague los portaobjetos en dos cambios de etanol al 95 % para eliminar los restos de solución y, a continuación, en otros tres cambios de etanol al 100 %.
2. Aclare los portaobjetos en tres cambios de xileno al 100 %.
3. Aplique un cubreobjetos con medio de montaje permanente.
4. Compatible con el protocolo de montador mediante el sistema VENTANA HE 600. Si desea obtener instrucciones más detalladas al respecto, consulte el Manual del usuario del sistema VENTANA HE 600.

PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

Como ejemplo de material de control positivo se encuentra el tejido humano FFPE positivo en bacterias acidorresistentes.³ El tejido de control debe ser una muestra de autopsia reciente, biopsia o cirugía, preparada o fijada con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de las secciones de la prueba. Estos tejidos se utilizan para hacer un seguimiento de todos los pasos que conlleva el análisis, desde la preparación del tejido hasta la tinción.

El uso de una sección de tejido fijada o procesada de forma diferente a la muestra de la prueba actúa como control en todos los pasos de reactivo y del método, salvo en los de fijación y procesamiento de tejidos. Los componentes celulares de otros elementos del tejido pueden servir como control negativo.

La práctica de laboratorio óptima consiste en incluir una sección de control positivo en el mismo portaobjetos que el tejido de la prueba. Esto contribuye a identificar fallos al aplicar los reactivos al portaobjetos. El tejido de control puede contener elementos de tinción tanto positiva como negativa y ambos sirven como control positivo y negativo.

El tejido de control se debe analizar en cada una de las sesiones.

Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para hacer un seguimiento del comportamiento correcto de los reactivos de la prueba y de los tejidos procesados, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente.

Si los componentes de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras de la prueba se deben considerar no válidos. Si los componentes de tejido negativos muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras del paciente también se deben considerar no válidos.

Las discrepancias no explicadas en los resultados de los controles deberían comunicarse al representante local de asistencia técnica de Roche de forma inmediata. Si los resultados de los controles de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no serán válidos. Es necesario identificar la causa y corregir el problema, así como repetir el análisis de las muestras del paciente.

INTERPRETACIÓN DE LAS TINCIONES Y RESULTADOS PREVISTOS

BenchMark Special Stains AFB Staining Kit se ha analizado para que presente las bacterias acidorresistentes.

- Bacterias acidorresistentes (AFB): Rojo
- Fondo: Azul

La bacteria aparece en forma de parches rojos con un aumento más reducido. A 100x, bajo el aceite, aparece solapándose a las estructuras con forma de varilla. Ciertos tipos

de bacterias acidorresistentes pueden observarse como polimorfos en función del tipo de organismo y el plano del corte.

Se ha observado una tinción citoplasmática granular no específica de rosa a roja en determinadas células inflamatorias.

Es posible que exista tinción rosa en los glóbulos sanguíneos, especialmente en los vasos sanguíneos de las zonas adiposas.⁷

LIMITACIONES ESPECÍFICAS

Únicamente se han utilizado y validado en este ensayo los portaobjetos para microscopio con carga positiva.

Únicamente se han analizado los organismos positivos en AFB. No se han identificado organismos específicos.

No se recomienda este método para la detección de *Mycobacterium Leprae*.^{2,3}

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

RENDIMIENTO DE ANÁLISIS

Se realizaron pruebas de tinción para evaluar la sensibilidad, especificidad y precisión y los resultados se indican a continuación.

Sensibilidad y especificidad

Se evaluaron la sensibilidad y especificidad analíticas de las bacterias acidorresistentes en varios estudios comparando dos métodos de detección distintos. Se prevé que se observe una tinción de las bacterias acidorresistentes en casos de pulmón con infección por bacteria acidorresistente, mientras que está prevista su ausencia en casos de tejido normal de apéndice y pulmón. En un total del 98 % de los casos de tejido evaluados (62/63) se obtuvo un resultado apto de tinción aceptable, tal y como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. La sensibilidad y especificidad de BenchMark Special Stains AFB Staining Kit se determinó mediante el análisis de los siguientes tejidos FFPE normales e infectados.

Tejido	N.º de casos aptos/analizados
Apéndice (normal)	22 / 23*
Pulmón (normal)	15 / 15
Pulmón (con infección por AFB)	25 / 25

* Un artefacto en un solo portaobjetos impidió su interpretación

Precisión

Los estudios de precisión se compararon con los diferentes portaobjetos con 9 casos de tejido infectado por AFB y un caso de tejido normal. Las pruebas de tinción y los portaobjetos de control se evaluaron de dos formas diferentes: 1) En ≥ 95 % de los portaobjetos de las muestras de la prueba se observaba una tinción de las bacterias acidorresistentes en color rojo brillante y una tinción de fondo en color azul claro; y 2) la comparación enmascarada por pares de los portaobjetos de la prueba con los portaobjetos de control mostraba que ≥ 90 % de los portaobjetos de la prueba se puntuaron como no inferiores a los portaobjetos de control. Se cumplieron todos los criterios de aceptación. Se llevaron a cabo los siguientes estudios de precisión con BenchMark Special Stains AFB Staining Kit:

1. Entre instrumentos: Se analizaron 180 portaobjetos en tres instrumentos BenchMark Special Stains diferentes (60 portaobjetos por instrumento y 18 portaobjetos por caso de tejido) con BenchMark Special Stains AFB Staining Kit. Los portaobjetos se evaluaron en cuanto a la tinción según los criterios apto y no apto. El estudio cumplía los criterios de aceptación.
2. Entre sesiones: Se analizaron 180 portaobjetos en tres instrumentos BenchMark Special Stains diferentes (20 portaobjetos por sesión y 3 sesiones al día por instrumento y 18 portaobjetos por caso de tejido) en dos días consecutivos con BenchMark Special Stains AFB Staining Kit. Los portaobjetos se evaluaron en cuanto a la tinción según los criterios apto y no apto. El estudio cumplía los criterios de aceptación.
3. Entre lotes: Se analizaron 180 portaobjetos (tres lotes con 60 portaobjetos por lote) en tres instrumentos BenchMark Special Stains diferentes con BenchMark Special Stains AFB Staining Kit. Los portaobjetos se evaluaron en cuanto a la tinción según los criterios apto y no apto. El estudio cumplía los criterios de aceptación.

RENDIMIENTO CLÍNICO

Los datos de rendimiento clínico pertinentes para el uso previsto de BenchMark Special Stains AFB Staining Kit se evaluaron mediante revisión sistemática de la documentación oportuna. Los datos obtenidos respaldan la utilización del dispositivo de acuerdo con su uso previsto.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. El grosor del corte puede afectar la calidad y la intensidad de la tinción. Si la tinción no es adecuada, póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche para obtener ayuda.
2. El tejido necrótico o autolizado puede presentar tinción no específica.
3. Si el control positivo es negativo, es posible que los tejidos se hayan recogido, fijado o desparafinado de forma incorrecta. Siga el procedimiento apropiado para llevar a cabo la recogida, el almacenamiento y la fijación.
4. Si el control positivo es negativo, asegúrese de que el portaobjetos lleva la etiqueta de código de barras correcta. Si el etiquetado del portaobjetos es correcto, compruebe el resto de los controles positivos de la misma sesión para saber si se han teñido los controles adecuadamente.
5. Si se presenta una tinción de fondo excesiva: una eliminación incompleta de la parafina puede provocar la aparición de artefactos en la tinción o la ausencia de esta. Si no se ha eliminado toda la parafina del portaobjetos, la sesión de tinción debería repetirse con una opción de desparafinado más prolongada, si fuera posible.
6. Si las secciones de tejido se pierden en el portaobjetos, compruebe que los portaobjetos tienen carga positiva.
7. La intensidad y tonalidad de la contratinción con anilino azul se ve afectada por el grosor de la sección de tejido. En los cortes menos gruesos, la contratinción es más clara.
8. Una conservación prolongada de los portaobjetos cargados en el instrumento una vez que ha finalizado la sesión puede afectar a la calidad y la intensidad de la tinción. Si la tinción no es adecuada, retire los portaobjetos de inmediato al finalizar la sesión y continúe con el procesamiento post-instrumento.
9. Si necesita llevar a cabo acciones correctivas, consulte la sección Instrucciones de uso, el Manual del usuario del instrumento o póngase en contacto con su representante local de asistencia técnica de Roche.

REFERENCIAS

1. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd edition. St. Louis, MO: C.V. Mosby Company; 1980.
2. Vilchère C, Kremer L. Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative Mycobacterium Tuberculosis: The Koch Paradox. Microbiology spectrum. 2017;5(2).
3. Bancroft JD, Gamble M. Theory and Practice of Histological Techniques. 2nd edition. Edinburgh: Churchill-Livingston; 1982.
4. Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
5. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
6. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
7. Horobin RW, Bancroft JD. Troubleshooting Histology Stains. New York: Churchill Livingstone; 1998.

NOTA: En este documento se ha usado el punto como separador decimal para marcar el borde entre la parte entera y la parte fraccionaria de los numerales con decimales. No se han usado separadores para las unidades de millar.

El resumen de los aspectos de seguridad y rendimiento se puede ver a continuación: <https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Símbolos

Ventana usa los siguientes símbolos y signos además de los indicados en la norma ISO 15223-1 (para EE. UU.: consulte en elabdoc.roche.com/symbols la definición de los símbolos usados):



Número mundial de artículo comercial



Identificación única del dispositivo



Indica la entidad que ha importado el producto sanitario en la Unión Europea

HISTORIAL DE REVISIONES

Rev.	Actualizaciones
D	Se ha actualizado al sección Precisión

PROPIEDAD INTELECTUAL

VENTANA, BENCHMARK, VENTANA HE y el logotipo de VENTANA son marcas comerciales de Roche. Todas las demás marcas comerciales pertenecen a sus respectivos propietarios.

© 2023 Ventana Medical Systems, Inc.

INFORMACIÓN DE CONTACTO



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606

