



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

MERIFLUOR®

Pneumocystis

Direct Immunofluorescent Detection Procedure for *Pneumocystis carinii* in Respiratory Tract Specimens

REF 222030

IVD In vitro diagnostic medical device

INTENDED USE

MERIFLUOR Pneumocystis is an in vitro procedure for the detection of *Pneumocystis carinii* cysts and trophozoites in direct smears of respiratory tract specimens.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Pneumocystis carinii is a unicellular fungus which causes life threatening pneumonia in severely immuno-compromised individuals.^{1,2} The available evidence indicates that most children experience mild or subclinical infection with *P. carinii* and that the organism may persist in a latent state until reactivation occurs following immuno-suppression.^{1,3} Until recently, the populations at risk have been premature infants, patients with hematopoietic malignancies or immunoglobulin defects, and patients receiving immunosuppressive treatment such as cortico-steroids for cancer or organ transplantation.^{1,2,4,5,6} Since 1981, the inherent susceptibility of individuals with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) has significantly increased the prevalence of pneumocystis pneumonia. Pneumocystis pneumonia develops in 60-85% of AIDS patients and is by far the most common opportunistic infection in this group.^{1,7,8}

Three developmental forms of *P. carinii* are discernible with light microscopy: the trophozoite, the sporozoite, and the cyst.^{1,9} Trophozoites, 2-5 µm in diameter, are pleomorphic and tend to cluster together in masses. Trophozoites undergo maturation to become cysts. The cyst, 5-8 µm in diameter, is the most easily recognized form of *P. carinii*. Cysts contain up to eight crescent or pleomorphic-shaped sporozoites, 1-2 µm in diameter, and tend to cluster in masses within an extracellular matrix material.

Currently, a clinical diagnosis of *P. carinii* pneumonia is based on radiologic evidence and direct microscopic observation of respiratory specimens using nonspecific techniques.^{1,9} Nonspecific staining methods, such as methenamine silver nitrate and toluidine blue 0, stain the cyst wall but have no affinity for trophozoites or sporozoites.^{1,9} Alternatively, the Wright Giemsa and Gram staining methods stain trophozoites and sporozoites, but fail to stain cyst walls.^{1,9} Due to the nonspecific nature of these stains proper identification of the organism has been difficult.^{10,13} Detection of *P. carinii* in bronchoalveolar lavage fluids, induced-sputum and impression smears of lung tissue has been accomplished by immunofluorescent assay.^{11,12,15}

MERIFLUOR Pneumocystis provides a simple, highly specific, direct immunofluorescent procedure for the identification of *P. carinii* cysts and trophozoites in respiratory tract specimens.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

MERIFLUOR Pneumocystis utilizes the principle of direct immunofluorescence. The Detection Reagent contains FITC labeled monoclonal antibodies directed against cell wall and matrix antigens of *P. carinii* cysts, sporozoites and trophozoites. Prepared slides of respiratory specimens are treated with the Detection Reagent. The monoclonal antibodies attach to pneumocystis antigens present in the specimen. The slides are rinsed to remove unbound antibodies, mounted with MERIFLUOR Mounting Medium, and examined for bright apple-green fluorescence and characteristic morphology of *P. carinii* cysts using a fluorescence microscope. Sporozoites, trophozoites and the extracellular matrix should also fluoresce. Background material present in the specimen is counterstained orange to red.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

The maximum number of tests obtained from this test kit is listed on the outer box.

- Detection Reagent** - FITC labeled anti-*P. carinii* monoclonal antibodies in a buffered solution containing protein, Evans Blue and 0.07% sodium azide.
- Mounting Medium** - Buffered glycerol containing an anti-quencher and 0.05% sodium azide.
- Microscope Slides**
- Transfer pipettes**

MATERIALS NOT PROVIDED

- P. carinii* positive control slides of human origin
- P. carinii* negative control slide
- Centrifuge
- Humidity chamber
- Wash bottle
- Microscope slide coverslips
- Acetone, reagent grade (store in tightly closed container to prevent absorption of water).
- 35-37 C incubator
- Deionized water or tap water
- Pipettes
- Dithiothreitol
- Fluorescence microscope, equipped with a filter systems for fluorescein isothiocyanate (FITC) with the following parameters: Excitation wavelength - 490-500, Barrier filter - 510-530.

PRECAUTIONS

- All reagents and components are for in vitro diagnostic use only.
- Do not mix reagents from different kit lot numbers.
- Do not use kit components beyond the indicated expiration date on the kit label.
- Protect the Detection Reagent from exposure to light.
- All reagents should be inverted gently before use.
- Clean microscope slides prior to use with 95% ethanol.
- Patient specimens may contain HIV or other infectious agents and should be handled by properly trained personnel and disposed of as potential biohazards. Wear disposable gloves while handling specimens and performing the test procedure.
- If specimen material is not seen upon scanning the slide wells, loss of sample may have occurred. This is usually due to an overly vigorous wash procedure, insufficient fixation of the specimen, or insufficient cleaning of the slide.
- The Detection Reagent contains Evans Blue which is a potential carcinogen. Avoid contact with skin. Wash area thoroughly if contact occurs.

WARNING: The reagents in this kit contain sodium azide, which is a skin irritant. Avoid skin contact with the kit components. Disposal of reagents containing sodium azide into lead or copper plumbing can result in the formation of explosive metal azides. This can be avoided by flushing with a large volume of water.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

Refer to the SDS, available at www.meridianbioscience.com for Hazards and Precautionary Statements.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the MERIFLUOR Pneumocystis kit is indicated on the kit label. To maintain optimal performance the kit should be stored at 2-8 C and returned promptly to the refrigerator after each use. **CAUTION: DO NOT FREEZE.**

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Bronchoalveolar lavage (BAL), bronchial wash (BW) and induced sputum (IS) specimens should be collected using standard procedures. Pretreatment of specimens with fixatives such as formaldehyde, paraformaldehyde, or ethanol is not recommended, as this can cause a decrease or loss of fluorescence.

The following chart summarizes the time frame in which specimens are suitable for processing with MERIFLUOR Pneumocystis:

	Unpreserved	About 1 month at 4 C
BAL/BW	Acetone fixed on slide	Stain within 8 hours or freeze at -20 C for up to 1 month
	Digested or non-digested	1 day at 4 C
Induced Sputa	Digested & frozen	1-2 months
	Acetone fixed on slide	Stain within 8 hours or freeze at -20 C for up to 1 month
Tissue	Unfixed	Freeze immediately or do touch prep and acetone fix on slide

A. Preparation of BW and BAL Specimens

- Centrifugation Method
 - Specimens should be concentrated to increase the recovery of *P. carinii*. Mix the specimen thoroughly, transfer a minimum of 5 mL to a centrifuge tube and centrifuge at 1,800 xg for 10 minutes. Remove and discard all but 0.5 mL of the supernatant. Thoroughly resuspend the pellet in the remaining 0.5 mL of fluid.
 - Remove 25-50 µL of the resuspended specimen with a transfer pipette (marking closest to tip is 50 µL) and place it on the appropriate well of a microscope slide.
 - Spread the specimen over the well using the side of the transfer pipette.
 - Continue immediately with staining (see **PROCEDURE**).
- Shandon Cytospin™ 2 Method
 - The concentration procedure may be omitted by centrifuging 0.5 mL-0.6 mL of unconcentrated BAL or BW at 900 rpm for 5 minutes using 1 white and 1 tan filter. The marking closest to the bulb of the transfer pipette (supplied with kit) is 0.3 mL.
 - Continue immediately with staining (see **PROCEDURE**).

B. Preparation of IS Specimens

Induced sputum specimens can be processed by preparing smears directly from sputa. However, increased recovery can be obtained by concentration after liquefaction of the sputa with dithiothreitol.^{11,13}

- Direct smears from IS.
 - With an applicator stick, gather all the opaque, white or cream-colored flecks of material present in the specimen to the periphery of the specimen.
 - Remove the flecks with a transfer pipette and place them on the appropriate well of a microscope slide.
 - Spread these flecks and their associated material over the well using the side of the transfer pipette.
 - Continue immediately with staining (see **PROCEDURE**).

C. Preparation of Biopsy Specimens

Transbronchial, open lung, or other biopsy specimens must not be formalin-fixed. Transport specimen in a container on gauze slightly moistened with saline. The tissue should not be immersed in saline nor allowed to dry as either condition can result in poor touch preparations.

1. Prepare a freshly cut surface on a fragment of tissue. Touch the cut surface of the specimen to an appropriately labeled microscope slide. Make several non-overlapping imprints within the well, avoiding smearing. The use of several cut surfaces will increase the opportunity to detect *P. carinii* organisms.
2. While imprints are still moist on the slide, fix by adding 1-2 drops of acetone and allow to air dry completely. Proceed with step 2 of **PROCEDURE**.

PREPARATION OF POSITIVE CONTROL

A positive control should be included each time the test is performed. Bronchoalveolar lavage or bronchial wash specimens previously confirmed as positive for *P. carinii* and which have not been treated with fixatives such as formaldehyde, paraformaldehyde or ethanol, may be used. Prepare control slides as described in **SPECIFIC PREPARATION**. Slides which have been acetone fixed may be frozen at -20 C for up to one month. It is not necessary to repeat acetone fixation on thawed slides. Control slides may also be obtained commercially. Positive control specimens must exhibit the staining characteristics of a positive specimen as described in **INTERPRETATION OF RESULTS**.

TEST PROCEDURE

1. Allow specimen to air dry, then fix by adding 1-2 drops of acetone to specimen on slide and allow to air dry completely. **NOTE: Specimens must be tested within 8 hours.**
2. Use a separate transfer pipette to place 50 µL (marking closest to tip) of Detection Reagent in each specimen and control well. With the transfer pipette spread the reagent over the entire well taking care not to disturb the specimen.
3. Incubate the slide in a humidified chamber for 30 minutes at 35-37 C.
4. Tap the slide gently on a paper towel to remove excess reagent. Use a wash bottle to rinse the slide with a gentle stream of water until the excess Detection Reagent has been removed. **NOTE: Do not submerge the slide during rinsing.** Exercise care during the rinse process to avoid disturbing the specimen or causing cross contamination of the specimens.
5. Remove excess water by tapping the slide on a clean paper towel. **NOTE: Do not allow the slide to dry.**
6. Add one or two drops of mounting medium to each slide and apply a coverslip.
7. Examine each well thoroughly using a fluorescent microscope at 200-300X magnification. Protect slide from light. **NOTE: The slide should be read immediately.** Otherwise store the slide at 2-8 C in the dark and read within 24 hours.

INTERPRETATION OF RESULTS

1. Positive test result: Any specimen which contains two typical cysts exhibiting apple-green fluorescence of characteristic morphology should be considered positive for the presence of *P. carinii*. Generally cysts, each 5-8 µm in diameter, are found together with trophozoites in clusters. Clusters can be variable in size and may appear with or without "honeycomb" like structures. Some cysts fluoresce evenly throughout their structure whereas other cysts may fluoresce mainly on their periphery and produce a "honeycomb" appearance within the clusters.^{12, 13} If no cysts are observed and symptoms persist, another specimen should be obtained and examined.
2. Negative test result: A specimen which fails to exhibit the characteristic fluorescence described above.

QUALITY CONTROL

This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.

1. A positive control specimen of human origin should be obtained to verify the proper performance of the kit.
2. At the time of each use the kit components should be visually examined for obvious signs of contamination, freezing or clumping.

If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.

EXPECTED VALUES

The MERIFLUOR Pneumocystis direct immuno-fluorescent test will identify the presence of *P. carinii* in respiratory specimens. The incidence of *P. carinii* infection varies between hospitals and patient populations. *Pneumocystis pneumonia* develops in 60-85% of untreated AIDS patients but is likely to be lower in populations receiving prophylactic antimicrobial therapy.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

MERIFLUOR Pneumocystis is an in vitro diagnostic test to aid in the diagnosis of *P. carinii* infection. The presence of *P. carinii* is associated with pneumonia in immunosuppressed individuals. In addition, the presence of cysts in a specimen does not preclude the existence of other microorganisms or another underlying condition as the causative agent of a patient's symptoms. The final diagnosis should be made by a clinician familiar with the history of the patient, the results of a physical examination, and the laboratory data. **NOTE: Meridian Bioscience has not evaluated the suitability of commercially marketed liquefaction reagents for treating sputa that will be tested by MERIFLUOR Pneumocystis. It is the users responsibility for validating the compatibility of specimens treated with such reagents with the reagents supplied as part of the MERIFLUOR assay.**

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Induced sputa and bronchoalveolar lavages were collected at three hospitals from patients suspected of having *Pneumocystis carinii* pneumonia. All specimens were stained with the MERIFLUOR Pneumocystis test kit and with a histologic stain: Wright-Giemsa (DiffQuik™) or Gomori methenamine silver. Specimens from two sites were also stained with a competitor's direct immunofluorescent test kit. The results of the 65 specimens included in the analysis are shown in Table 1.

Table 1

Histologic Stain		Competitor's Assay	
+	-	+	-
44	1*	31	0
2	18	0	12

MERIFLUOR Pneumocystis

Sensitivity	96%
Specificity	95%
Agreement with histologic stain	95%
Agreement with competitor assay	100%

*A bronchoalveolar lavage obtained from this patient 24 hours later was positive by both histologic and immunofluorescent stains, indicating an increased sensitivity for the MERIFLUOR Pneumocystis test.

The following organisms from culture did not fluoresce when tested with MERIFLUOR Pneumocystis:

Aspergillus flavus, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Legionella pneumophila*, *Nocardia asteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Toxoplasma gondii*

ITALIANO

MERIFLUOR[®]

Pneumocystis

Test in immunofluorescenza diretta per la ricerca di
Pneumocystis carinii nei campioni del tratto respiratorio

REF 222030

IVD Dispositivo medico diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

Il test MERIFLUOR Pneumocystis è un test in vitro per la ricerca di cisti e di trofozoiti di *Pneumocystis carinii* nelle secrezioni respiratorie.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Pneumocystis carinii è un fungo unicellulare che provoca una polmonite molto pericolosa nei pazienti gravemente immunodepressi.^{1,2} I dati attualmente disponibili indicano che la maggior parte dei bambini è soggetta a forme di infezione da *P. carinii* che passano spesso inosservate e che il microrganismo può rimanere in fase di quiescenza fino a quando non si verificano le condizioni favorevoli alla proliferazione, cioè nelle situazioni di compromissione del sistema immunitario.^{1,3} Fino a poco tempo fa, i gruppi di pazienti a rischio erano costituiti dai bambini prematuri, dai pazienti con leucemie o con ipogammaglobulinemie e dai soggetti in trattamento immunosoppressivo in seguito a tumori o a trapianti d'organo.^{1,2,4,5,6} A partire dal 1981 è stato osservato un notevole aumento di casi di infezione da *Pneumocystis* a causa dell'aumento dei soggetti affetti da sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS). Infatti, la polmonite da *P. carinii* in questi pazienti ha un'incidenza variabile dal 60% all'85% e rappresenta di gran lunga l'infezione opportunista più frequente.^{1,7,8}

Al microscopio ottico si possono individuare tre diversi stadi del ciclo vitale: i trofozoiti, gli sporozoiti e le cisti.^{1,9} I trofozoiti, 2-5 µm di diametro, sono pleomorfi e tendono a raggrupparsi in masse di discrete dimensioni. I trofozoiti subiscono un processo di maturazione che li trasforma in cisti. Le cisti, 5-8 µm di diametro, rappresentano lo stadio di *P. carinii* più facilmente osservato: esse possono contenere fino ad 8 sporozoiti di forma variabile e con un diametro di 1-2 µm. Anche le cisti tendono a raggrupparsi in cluster all'interno degli spazi extracellulari.

Attualmente la diagnosi di polmonite da *P. carinii* è basata sull'esame radiografico e sull'osservazione microscopica di strisci di secrezioni respiratorie previa colorazione con tecniche non specifiche.^{1,9} Tra le tecniche di colorazione più usate si possono ricordare la colorazione con argento-metenamina e quella con il blu di toluidina O, che colorano la parete delle cisti, ma non i trofozoiti e gli sporozoi, mentre la colorazione di Giemsa e quella di Gram-Weigert colorano trofozoiti e sporozoi, ma non le cisti.^{1,9} La corretta identificazione di questo parassita è condizionata quindi dalla mancanza di specificità di questi metodi di colorazione.^{10,13} La rilevazione della presenza di *P. carinii* nel lavaggio bronco-alveolare, nell'espettorato indotto e nelle apposizioni bioptiche è stata ottenuta anche mediante test di immunofluorescenza.^{11,12,13}

MERIFLUOR Pneumocystis è un test in immunofluorescenza diretta, semplice, altamente specifico per la ricerca delle cisti e dei trofozoiti di *P. carinii* nei campioni respiratori.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test MERIFLUOR Pneumocystis è basato su una tecnica di immunofluorescenza diretta. Il reagente di ricerca contiene anticorpi monoclonali (marcati con fluoresceina, FITC) diretti contro antigeni della parete cellulare e della matrice citoplasmatica delle cisti, dei trofozoiti e degli sporozoi di *P. carinii*. Gli strisci di secrezioni respiratorie opportunamente preparati sono trattati con il reagente di ricerca: gli anticorpi monoclonali si legano agli antigeni di *P. carinii* eventualmente presenti. I vetrini vengono poi lavati per eliminare l'eccesso di coniugato, montati con il fluido di montaggio fornito con il kit ed esaminati mediante un microscopio a fluorescenza per rilevare la presenza di fluorescenza verde-mela e della tipica morfologia *P. carinii*: anche gli sporozoi, i trofozoiti e la matrice extracellulare dovrebbero risultare fluorescenti. Il resto del vetrino ed il materiale di fondo vengono colorati in rosso-arancio dal colorante di contrasto.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

Il numero massimo di analisi eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

- Reagente di ricerca** - Anticorpi monoclonali anti-*P. carinii* marcati con FITC, diluiti in soluzione proteica tamponata, contenente blu di Evans e sodio azide allo 0,07%.
- Liquido di montaggio** - Fluido di montaggio composto da glicerolo tamponato, da un agente inibitore della fotosensibilizzazione e da sodio azide allo 0,05%.
- Vetrini per immunofluorescenza**
- Pipette monouso**

MATERIALI NON FORNITI

- Vetrini di positivo controllo per *P. carinii* di origine umana
- Vetrini di negativo controllo per *P. carinii*
- Centrifuga
- Camera umida
- Spruzzetta per i lavaggi
- Vetrini coprioggetto
- Acetone in formulazione reagente (conservare in recipienti a chiusura ermetica per prevenire l'assorbimento di acqua)
- Termostato a 35-37 C
- Acqua distillata o deionizzata
- Pipette
- Ditiotritolo
- Microscopio a fluorescenza fornito di filtro per l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) con i seguenti parametri: lunghezza d'onda di eccitazione – 490-500, filtro barriera – 510-530

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti e i componenti sono destinati esclusivamente ad uso diagnostico in vitro.
- Non mescolare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Non usare reagenti scaduti. La data di scadenza è stampata sull'etichetta esterna.
- Proteggere il reagente di ricerca dalle fonti di luce.
- Mescolare bene, e delicatamente mediante capovolgimento di tutti i reagenti prima dell'uso.
- Pulire i vetrini con etanolo al 95% prima dell'uso.
- I campioni biologici possono contenere il virus HIV oppure altri agenti infettivi e pertanto devono essere maneggiati da personale tecnicamente preparato ed eliminati come materiali potenzialmente infettivi. Indossare guanti monouso durante tutte le fasi di trattamento dei campioni e di esecuzione del test.
- Non lasciar seccare il vetrino dopo l'aggiunta del reagente di ricerca.
- Se all'atto dell'esame microscopico non si nota niente sul vetrino, può darsi che il materiale sia stato perso durante il lavaggio. Questo normalmente è causato da un lavaggio troppo vigoroso, da un incompleto fissaggio del campione oppure da un'insufficiente pulitura del vetrino.
- Il reagente di ricerca contiene Blu di Evans che è potenzialmente cancerogeno. Evitare il contatto con la pelle: se ciò avviene, lavare la parte interessata con acqua corrente.

NOTA: I reagenti contenuti nel kit contengono sodio azide, che è un composto dermoirritante. Evitare il contatto con la cute. L'eliminazione di reagenti contenenti sodio azide nelle tubature di scarico di piombo o di rame può provocare la formazione di azidi metalliche esplosive. Tale pericolo può essere evitato lasciando scorrere notevoli quantità di acqua durante tale operazione.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è segnata sull'etichetta esterna del kit. Conservare il kit a 2-8 C e rimetterlo velocemente in frigorifero dopo ciascun utilizzo. **ATTENZIONE: NON CONGELARE.**

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni di lavaggio bronco-alveolare (**BAL**), broncoaspirato (**BW**) e di espettorato indotto (**IS**) devono, essere raccolti mediante procedure standard. Il pretrattamento dei campioni con fissativi quali formaldeide, paraformaldeide o etanolo vengono è sconsigliati, perché può causare una diminuzione o addirittura una totale perdita di fluorescenza.

La seguente tabella schematizza i tempi di conservazione dei campioni per l'utilizzo del test MERIFLUOR Pneumocystis:

BAL/BW	Non conservato	1 mese a 4 C
	Fissato su vetrino con acetone	Colorare entro 8 ore o congelare a -20 C fino a 1 mese
Espettorato Indotto	Digerito o non digerito	1 giorno a 4 C
	Digerito e congelato	1-2 mesi
Biopsia	Fissato su vetrino con acetone	Colorare entro 8 ore o congelare a -20 C fino a 1 mese
	Non fissato	Congelare immediatamente o preparare un'apposizione bioptica e fissarla su vetrino con acetone

A. Preparazione dei campioni di BAL e di BW.

- Metodo di centrifugazione
 - Il campione deve essere concentrato per aumentare le probabilità di evidenziare *P. carinii*. Mescolare accuratamente il campione, trasferire un volume minimo di 5 mL in una provetta da centrifuga e centrifugare a 1800 xg per 10 minuti. Eliminare il surmatante, conservandone 0,5 mL: risospendere il sedimento nel surmatante rimasto.
 - Prelevare 25-50 µL di sedimento mediante una delle pipette monouso fornite (la prima tacca vicino alla punta indica 50 µL) e distribuirli sul corrispondente pozzetto del vetrino per immunofluorescenza.
 - Distribuire il campione sopra il pozzetto avvalendosi del lato della pipetta monouso.
 - Eeguire immediatamente la colorazione (vedi **METODICA**).
- Metodo di citocentrifugazione (Shandon Cytospin™ 2)
 - La concentrazione può essere omessa centrifugando 0,5-0,6 mL di **BAL** o di **BW** non concentrati a 900 rpm per 5 minuti usando un filtro bianco ed uno color nocciola. La tacca più vicina al bulbo delle pipette monouso fornite indica un volume di 0,3 mL.
 - Eeguire immediatamente la colorazione (vedi **METODICA**).

B. Preparazione dei campioni di IS.

L'espettorato indotto può essere esaminato preparando vetrini direttamente dal campione. Tuttavia, si può ottenere una maggiore probabilità di evidenziazione del microrganismo effettuando concentrazione dopo fluidificazione del campione con ditiotritolo.^{11,13}

- Preparazione di strisci diretti di **IS**.
 - Raccogliere tutto il materiale opaco, bianco o color crema presente nel campione utilizzando un bastoncino di legno e trasferirlo alla periferia del campione.
 - Prelevare questo materiale mediante una delle pipette monouso fornite e distribuirlo sul corrispondente pozzetto del vetrino per immunofluorescenza.
 - Distribuire questo materiale sull'intera superficie del pozzetto aiutandosi con il lato della pipetta.
 - Eeguire immediatamente la colorazione (vedi **METODICA**).

C. Preparazione dei campioni bioptici.

I campioni bioptici (transbronchiali, chirurgici, ecc.) non devono essere per nessun motivo fissati in formalina. Si consiglia di trasportare i campioni in un contenitore contenente una garza leggermente inumidita con soluzione fisiologica sterile. I frammenti bioptici non devono essere immersi in fisiologica né lasciati seccare, poiché entrambe queste condizioni impediscono di preparare delle buone apposizioni.

- Sezionare il frammento bioptico in modo da esporre una superficie fresca. Preparare le apposizioni premendo tale superficie su un vetrino per immunofluorescenza, avendo l'accortezza di non sovrapporre le aree ed evitando di strisciare il campione. Si può aumentare la probabilità di evidenziazione di *P. carinii* sezionando il campione più volte ed usando le superfici fresche.
- Fissare i vetrini in acetone per 5-10 minuti mentre le apposizioni sono ancora umide. Procedere con il punto 2 della **METODICA**.

PREPARAZIONE DEL CONTROLLO POSITIVO

Ogni volta che si esegue il test si dovrebbe includere un controllo positivo. Un qualsiasi campione di broncolavaggio o di broncoaspirato, precedentemente identificato come positivo per *P. carinii* e non trattato con fissativi come formaldeide, paraformaldeide ed etanolo, può essere usato come controllo positivo. Preparare i vetrini di controllo come indicato nella sezione **PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**. I vetrini fissati in acetone possono essere congelati a -20 C per 1 mese. Non è necessario ripetere la fissazione con acetone sui vetrini scongelati. In commercio si trovano alcuni vetrini di controllo pronti che possono essere utilizzati con questo kit. I vetrini di controllo devono mostrare la tipica colorazione dei campioni positivi descritta nella sezione **INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**.

PROCEDURA DEL TEST

1. Lasciar asciugare all'aria i campioni fino a quando sono completamente seccati e quindi fissarli per 5-10 minuti in acetone. **NOTA: i vetrini fissati in acetone devono essere testati entro 8 ore.**
2. Usando una pipetta monouso, distribuire 50 µL di reagente di ricerca su ciascun pozzetto contenente i campioni o il controllo. Coprire con il reagente l'intera superficie del pozzetto senza toccare il materiale.
3. Incubare i vetrini a 35-37 C per 30 minuti in camera umida.
4. Eliminare l'eccesso di reagente dai vetrini scuotendoli delicatamente su un tovagliolo di carta. Usando una spruzzetta, lavare i vetrini con un getto di acqua non troppo violento fino a quando il rimanente Reagente di ricerca è stato allontanato. **NOTA: Non immergere i vetrini nel liquido di lavaggio.** Durante il lavaggio bisogna evitare accuratamente di provocare il distacco del materiale dal vetrino o di causare contaminazioni crociate tra i pozzetti.
5. Eliminare l'eccesso di acqua dai vetrini scuotendoli delicatamente su un tovagliolo di carta. **NOTA: non lasciar seccare il vetrino.**
6. Distribuire 1-2 gocce di fluido di montaggio su ciascun vetrino e coprire con il vetrino coprioggetto.
7. Esaminare accuratamente ciascun pozzetto mediante microscopio a fluorescenza usando un ingrandimento di 200-300X. Proteggere i vetrini dalla luce. **NOTA: i vetrini devono essere esaminati immediatamente.** Qualora ciò non fosse possibile, possono essere conservati al buio per 24 ore a 2-8 C.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

1. Risultato positivo: qualsiasi campione che contiene almeno 2 cisti che mostrano la caratteristica fluorescenza verde-mela e la morfologia tipica deve essere considerato positivo per *P. carinii*. Di solito le cisti, di diametro compreso tra 5 ed 8 µm, si trovano in cluster con i trofozoiti. Tali cluster possono avere dimensioni variabili e presentarsi o meno con una struttura simile ad un nido d'ape. Alcune cisti mostrano una fluorescenza uniforme, mentre altre possono apparire più fluorescenti alla periferia, con un aspetto a nido d'ape internamente.^{12, 13} Se non si osservano cisti ed il paziente presenta una sintomatologia riferibile a polmonite da *P. carinii*, si consiglia di raccogliere un secondo campione e di ripetere il test.
2. Risultato negativo: se non si nota alcuna fluorescenza specifica il campione deve essere considerato negativo.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, statali, nazionali o dagli enti di accreditamento.

1. Usare un campione di controllo di origine umana per verificare il corretto funzionamento dei reagenti.
2. Ogni volta che si usa il kit si deve esaminare ciascun flacone di reagenti per verificare che non presenti segni evidenti di contaminazione microbiologica, di congelamento o di coaguli.

Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (Italia +390331433636).

VALORI ATTESI

Il test MERIFLUOR Pneumocystis evidenzia la presenza di *P. carinii* nei campioni di secrezioni respiratorie. L'incidenza dell'infezione da *P. carinii* varia da un ospedale all'altro e da un gruppo di pazienti all'altro. La polmonite da *P. carinii* colpisce il 60-85% dei pazienti affetti da AIDS non sottoposti a terapia, ma probabilmente ha un'incidenza inferiore nei soggetti in trattamento profilattico con opportuni farmaci antimicrobici.

LIMITAZIONI DELLA METODICA

Il test MERIFLUOR Pneumocystis è un test in vitro per la diagnosi dell'infezione da *P. carinii*. La presenza di *P. carinii* è associata a polmonite nei soggetti immunodepressi. Inoltre, la presenza di cisti in un campione non preclude la possibilità che siano presenti altri microrganismi o altre condizioni patologiche come causa della sintomatologia del paziente. La diagnosi finale deve essere fatta dal medico curante sulla base dell'anamnesi, dell'esame obiettivo e del risultato di tutti gli esami di laboratorio eseguiti. **NOTA:** Meridian Bioscience non ha valutato l'idoneità dei reagenti di liquefazione disponibili in commercio per il trattamento degli espettorati che saranno testati con MERIFLUOR Pneumocystis. È responsabilità dell'utente convalidare la compatibilità dei campioni trattati con tali reagenti con i reagenti forniti come parte del test MERIFLUOR.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Campioni di espettorato indotto e di broncolavaggio sono stati raccolti presso tre ospedali da pazienti con sintomatologia riferibile a polmonite da *P. carinii*. Tutti i campioni sono stati esaminati mediante il kit MERIFLUOR Pneumocystis e mediante colorazione istologica: Giemsa (Diff-Quick™) oppure argento-metenamina secondo Gomori. I campioni provenienti da due ospedali sono stati esaminati anche mediante un altro kit di immunofluorescenza diretta reperibile in commercio. I risultati ottenuti sui 65 campioni esaminati sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1

Colorazione istologica		Test della concorrenza	
+	-	+	-
44	1*	31	0
2	18	0	12

Sensibilità	96%
Specificità	95%
Concordanza con colorazione istologica	95%
Concordanza con test della concorrenza	100%

*Un successivo lavaggio broncoalveolare di questo paziente, raccolto 24 ore dopo, si è rivelato positivo sia con la colorazione istologica che con l'immunofluorescenza, dimostrando la maggiore sensibilità MERIFLUOR Pneumocystis.

I seguenti microrganismi, isolati in coltura, non hanno mostrato reazioni positive quando testati con il test MERIFLUOR Pneumocystis:

Aspergillus flavus, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Legionella pneumophila*, *Nocardia asteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Toxoplasma gondii*

FRANÇAIS

MERIFLUOR®

Pneumocystis

Méthode de détection directe par immunofluorescence de *Pneumocystis carinii* dans des échantillons du système respiratoire.

REF 222030

IVD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LA METHODE

MERIFLUOR Pneumocystis est une méthode in vitro de détection des kystes et des trophozoïtes de *Pneumocystis carinii* dans des frottis directs d'échantillons du système respiratoire.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Pneumocystis carinii est un champignon unicellulaire qui provoque des pneumonies pouvant être mortelles chez des personnes sévèrement immunodéficientes.^{1, 2} Les données disponibles indiquent que la plupart des enfants connaissent des infections modérées ou subcliniques avec *P. carinii* et que le parasite peut persister à l'état latent jusqu'à ce qu'une réactivation se produise suite à une immunodéficience.^{1, 3} Jusqu'à récemment, les populations à risque étaient les enfants prématurés, les patients atteints de maladie hématopoïétique ou présentant de graves déficits immunitaires, et les patients traités par immunosuppresseurs comme les corticostéroïdes dans le traitement des cancers ou dans le cas de transplantations d'organes.^{1, 2, 4, 5, 6} Depuis 1981, la susceptibilité inhérente aux personnes souffrant de Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) a considérablement augmenté la fréquence des pneumocystoses. Les pneumocystoses se développent chez 60 à 85% des sujets atteints de SIDA et sont de loin les infections opportunistes les plus communes dans ce groupe.^{1, 7, 8}

Trois formes de développement de *P. carinii* sont identifiables sous microscope photonique: le trophozoïte, le sporozoïte et le kyste. Les trophozoïtes, de 2-5 µm de diamètre, sont polymorphes et ont tendance à se regrouper ensemble en masses. Les trophozoïtes subissent une maturation et deviennent des kystes. Le kyste, de 5-8 µm de diamètre, est la forme la plus facilement reconnaissable de *P. carinii*. Les kystes contiennent jusqu'à 8 sporozoïtes ovalaires ou falciformes, de 1-2 µm de diamètre, et tendent à se regrouper en masses à l'intérieur d'un matériel matriciel extracellulaire.

Actuellement, le diagnostic clinique de la pneumonie à *P. carinii* est basé sur des données radiologiques et une observation microscopique directe des échantillons pulmonaires utilisant des techniques non spécifiques.^{1, 9} Des techniques de coloration non spécifiques, telles que l'imprégnation à l'argent ou la coloration au Bleu de Toluidine O, colorent les parois du kyste, mais ne mettent pas en évidence les trophozoïtes ou les sporozoïtes.^{1, 9} Etant donnée la nature non spécifique de ces colorations, l'identification correcte de ces organismes était difficile.^{10, 13} La détection de *P. carinii* dans les produits de lavage broncho-alvéolaire, d'expectoration, et de biopsie pulmonaire, a été finalement réalisée par un test d'immunofluorescence.^{11, 12, 13}

MERIFLUOR Pneumocystis est un test d'immunofluorescence direct, à la fois simple et hautement spécifique pour l'identification des kystes et des trophozoïtes de *P. carinii* dans des échantillons du tractus respiratoire.

PRINCIPE DU TEST

MERIFLUOR Pneumocystis utilise le principe de l'immunofluorescence directe. Le Réactif de Détection contient un anticorps monoclonal marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), dirigé contre la paroi cellulaire et les antigènes de la matrice des kystes, des sporozoïtes et des trophozoïtes de *P. carinii*. Des lames préparées d'échantillons pulmonaires sont traitées avec le Réactif de Détection. L'anticorps monoclonal fixe les antigènes de pneumocystis présents dans l'échantillon. Les lames sont rincées pour éliminer les anticorps non fixés, et montées avec le milieu de montage MERIFLUOR, puis observées à la recherche de la fluorescence vert pomme et de la morphologie caractéristique des kystes de *P. carinii* sous microscope à fluorescence. Les sporozoïtes, les trophozoïtes et la matrice extracellulaire doivent être également fluorescents. Les autres éléments présents dans la préparation sont colorés en orange à rouge par le contre colorant.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

1. **Réactif de détection** - Anticorps monoclonaux anti-*P. carinii* marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dans une solution tampon contenant des protéines, du Bleu Evans et 0,07% d'azide de sodium.
2. **Milieu de montage** - Solution de glycérol tamponnée contenant un anti-blanchiment de fluorescence et 0,05% d'azide de sodium.
3. **Lames de microscopes**
4. **Pipettes de transfert**

MATERIEL NON FOURNI

1. Lames de contrôle positif *P. carinii* d'origine humaine
2. Lames de contrôle négatif *P. carinii*
3. Centrifugeuse
4. Chambre humide
5. Pissette
6. Lamelles couvre-lame de microscope
7. Acétone (conserver dans un conteneur étanche pour empêcher l'absorption d'eau)
8. Incubateur 35-37 C
9. Eau désionisée ou eau du robinet
10. Pipettes
11. Agent liquéfiant Dithiothréitol
12. Microscope à fluorescence, équipé en filtre pour le FITC avec les paramètres suivants: longueur d'onde d'excitation 490-500 nm, filtre barrière à 510-530nm.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs et les composants fournis sont exclusivement destinés au diagnostic in vitro.
2. Ne pas mélanger les réactifs de coffrets de lots différents.
3. Ne pas utiliser les composants du coffret au-delà de la date d'expiration.
4. Conserver le Réactif de Détection à l'abri de la lumière.
5. Tous les réactifs doivent être mélangés doucement, en renversant les flacons, avant usage.
6. Nettoyer les lames de microscope avec de l'éthanol 95% avant utilisation.
7. Les échantillons de patients peuvent contenir du VIH ou d'autres agents infectieux et doivent être manipulés par du personnel correctement formé, et éliminés comme du matériel potentiellement infectieux. Porter des gants jetables pendant la manipulation des échantillons et la réalisation du test.
8. Eviter que l'échantillon sèche lorsque le Réactif de Détection a été ajouté.
9. Si aucun matériel n'est observable lors de lecture des puits des lames, c'est qu'il y a eu perte de l'échantillon. Cela est généralement dû à une procédure de lavage excessivement vigoureuse, à une fixation insuffisante de l'échantillon ou à un nettoyage de la lame trop succint.
10. Le Réactif de Détection contient du Bleu Evans, qui est potentiellement cancérigène. Eviter le contact avec la peau. En cas de contact, laver minutieusement la partie touchée.

ATTENTION: Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium, qui est un irritant cutané. Eviter le contact de ces composants avec la peau. L'élimination des réactifs contenant de l'azide de sodium dans des canalisations en cuivre ou en plomb peut conduire à la formation d'azides métalliques explosifs. Cela peut être évité en rinçant abondamment avec de l'eau.

DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version).

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date de péremption du coffret MERIFLUOR-Pneumocystis est indiquée sur l'étiquette de la boîte. Afin de préserver les performances optimales de ce test, conserver le coffret à 2-8 C et le replacer rapidement au réfrigérateur après chaque utilisation. **ATTENTION: NE PAS CONGELER**

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les produits de lavage broncho-alvéolaire (LA), de lavage bronchial (LB) et les expectorations (EX) doivent être collectés en utilisant des procédures standards. Le pré-traitement des échantillons avec des agents fixateurs tels que formaldéhyde, para-formaldéhyde ou éthanol n'est pas conseillé, car il peut entraîner une diminution ou une perte de la fluorescence.

Le tableau ci-dessous résume les échelles de temps convenables pour l'utilisation des échantillons avec la procédure MERIFLUOR Pneumocystis:

LA/LB	Sans conservateur	Environ 1 mois à 4 C
	Lames fixées dans l'acétone	Utiliser dans les 8 heures ou congeler à -20 C
EXPECTORATION	Digéré ou non digéré	1 jour à 4 C
	Digéré et congelé	1-2 mois
	Lames fixées dans l'acétone	Utiliser dans les 8 heures ou congeler à -20 C et conserver jusqu' à 1 mois
TISSU	Non fixé	Congeler immédiatement ou déposer sur lame et fixer les lames à l'acétone

A. Préparation des échantillons LA et LB

1. Méthode de centrifugation
 - a. Les échantillons doivent être concentrés pour augmenter la récupération de *P. carinii*. Mélanger les échantillons minutieusement, transférer un volume minimum de 5 mL dans des tubes à centrifugation et centrifuger à 1 800 g pendant 10 minutes. Eliminer le surnageant en laissant 0,5 mL de liquide. Resuspendre minutieusement le culot dans ces 0,5 mL de liquide restant.
 - b. Prélever 25-50 µL de l'échantillon resuspendu à l'aide d'une pipette de transfert (la graduation la plus proche de la pointe correspond à 50 µL) et placer le volume dans le puits approprié de la lame de microscope.
 - c. Etaler l'échantillon sur toute la surface du puits en utilisant la pipette de transfert.
 - d. Poursuivre immédiatement par l'étape de coloration (voir la section PROCEDURE).
2. Méthode Shandon Cytospin™ 2
 - a. La procédure de concentration peut être omise en centrifugeant 0,5-0,6 mL de LA ou LB non concentré à 900 rpm pendant 5 minutes en utilisant 1 filtre blanc et 1 filtre foncé. La graduation la plus proche de la poire de la pipette de transfert (fournie avec le coffret) correspond à 0,3 mL.
 - b. Poursuivre immédiatement par l'étape de coloration (voir la section PROCEDURE).

B. Préparation des échantillons d'expectoration (EX)

Les échantillons d'expectoration peuvent être préparés en réalisant un frottis direct à partir du crachat. Cependant, une meilleure détection sera obtenue par concentration après liquéfaction du crachat avec du dithiothréitol.^{11,13}

1. Frottis directs des EX
 - a. A l'aide d'un bâtonnet applicateur, rassembler toutes les petites particules opaques, blanches ou de couleur crème du matériel présent dans l'échantillon, à la périphérie de l'échantillon.
 - b. Récupérer les particules à l'aide d'une pipette de transfert et les placer dans le puits approprié de la lame de microscope.
 - c. Etaler les particules et leur matériel associé sur toute la surface du puits de la lame en utilisant la pipette de transfert.
 - d. Poursuivre immédiatement par l'étape de coloration (voir section PROCEDURE).

C. Préparation d'échantillon de biopsie

Les échantillons de biopsie transbronchique, de biopsie pulmonaire chirurgicale et autres échantillons de biopsie ne doivent pas être fixés au formol. Transporter les échantillons sur de la gaze légèrement humidifiée avec un tampon physiologique dans un conteneur. Le tissu ne doit ni être immergé dans la solution physiologique ni séché, car l'une ou l'autre de ces conditions peut diminuer la capacité d'adhésion de la préparation sur la lame.

1. Couper une tranche du fragment de tissu frais. Poser la coupe de l'échantillon sur une lame de microscope adéquate. Placer plusieurs tranches dans le puits en évitant tout chevauchement. L'utilisation de plusieurs coupes augmentera les chances de détection de *P. carinii*.
2. Alors que les coupes sont toujours humides sur la lame, les fixer en ajoutant 1 à 2 gouttes d'acétone, et les laisser sécher complètement à l'air libre. Continuer par l'étape 2 de la PROCEDURE.

PREPARATION DES CONTROLES POSITIFS

Un contrôle positif doit être inclus à chaque fois que le test est réalisé. Les produits du lavage broncho-alvéolaire ou du lavage bronchial qui ont été démontrés positifs pour *P. carinii* et qui n'ont pas été traités avec des agents fixateurs tels que formaldéhyde, para-formaldéhyde ou éthanol, peuvent être utilisés. Préparer les lames de contrôle comme décrit dans la section PREPARATION DES ECHANTILLONS. Les lames qui ont été fixées à l'acétone doivent être congelées à -20 C et peuvent être ainsi conservés pendant 1 mois. Il n'est pas nécessaire de répéter l'étape de fixation à l'acétone une fois les lames décongelées. Des lames de contrôles positifs peuvent être également obtenues au près d'un distributeur. Les échantillons positifs doivent montrer les caractéristiques d'une coloration d'un échantillon positif comme décrit dans la section INTERPRETATION DES RESULTATS.

PROCEDURE DE TEST

1. Laisser les échantillons sécher à l'air libre et les fixer par addition d'une ou de deux gouttes d'acétone sur la lame. Laisser sécher complètement la lame à l'air libre. **REMARQUE: Les échantillons doivent être testés dans les 8 heures.**
2. Utiliser une nouvelle pipette de transfert pour ajouter 50 µL (graduation la plus proche de la pointe) du Réactif de Détection dans chaque puits d'échantillon et de contrôle. Avec la pipette de transfert étaler le réactif sur toute la surface du puits en prenant garde de ne pas abîmer la préparation.
3. Incuber la lame en chambre humide pendant 30 minutes à 35-37 C.
4. Eliminer le réactif en tapotant doucement la lame sur un papier absorbant. A l'aide d'une pissette rincer doucement les lames à l'eau jusqu'à élimination complète du réactif de Détection. **REMARQUE: Ne pas submerger les lames pendant cette étape de lavage.** Cette étape nécessite des précautions pour éviter de faire bouger les préparations ou de créer des contaminations croisées.
5. Eliminer l'excès d'eau en tapotant la lame sur du papier absorbant propre. **REMARQUE: Ne pas laisser sécher les lames.**
6. Ajouter une goutte du milieu de montage sur chaque lame et recouvrir avec une lamelle.
7. Observer soigneusement chaque puits sous un microscope à fluorescence à un grossissement de 200-300. Protéger les lames de la lumière. **REMARQUE: Les lames doivent être lues immédiatement. Sinon les conserver à 2-8 C à l'obscurité et les observer dans les 24 heures.**

INTERPRETATION DES RESULTATS

- Résultat positif: Tout échantillon qui contient deux kystes typiques montrant une fluorescence vert pomme de morphologie caractéristique doit être considéré comme positif pour la présence de *P. carinii*. Généralement, les kystes, chacun de 5-8 µm de diamètre, sont trouvés avec les trophozoïtes formant des clusters. Les clusters ont des tailles variables et peuvent apparaître avec ou sans les structures alvéolaires de type "nids d'abeille". Pour certains kystes la fluorescence est régulière à travers toute leur structure, alors que pour d'autres la fluorescence se situe principalement à la périphérie et produit une structure alvéolaire de type "nids d'abeille" à l'intérieur du cluster.^{12, 13} Si aucun kyste n'est observé mais que les symptômes persistent, un autre échantillon doit être obtenu et testé de nouveau.
- Résultat négatif: Tout échantillon qui ne présente aucune fluorescence caractéristique comme cela est décrit ci-dessus.

CONTROLE DE QUALITE

Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et / ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.

- Un échantillon de contrôle positif d'origine humaine doit être obtenu afin de vérifier les performances propres du test.
- A chaque utilisation, les composants du coffret doivent être examinés afin de visualiser tous signes de contamination, de congélation ou d'aggrégation.

Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.

VALEURS ATTENDUES

Le test d'immunofluorescence direct MERIFLUOR Pneumocystis permet l'identification de la présence de *P. carinii* dans les échantillons pulmonaires. L'incidence de l'infection par *P. carinii* varie entre les hôpitaux et les populations de patients. La pneumocystose se développe chez 60 à 85% des patients atteints de SIDA non traité, mais ce pourcentage est probablement inférieur dans les populations recevant une thérapie prophylactique antimicrobienne.

LIMITES DU TEST

MERIFLUOR Pneumocystis est un test de diagnostic in vitro pour aider au diagnostic de l'infection par *P. carinii*. La présence de *P. carinii* est la cause de pneumonies chez les individus immunodéficients. De plus, la présence de kystes dans les échantillons n'exclut en aucun cas l'existence d'autres microorganismes ou d'une autre condition sous jacente qui pourraient être également responsables des symptômes du patient. Le diagnostic final est effectué par le médecin en tenant compte à la fois de l'historique du patient, des résultats de l'examen physique et du laboratoire. REMARQUE: L'utilisation des réactifs de liquéfaction disponibles sur le marché pour traiter les expectorations qui seront analysées par MERIFLUOR Pneumocystis, n'a pas été évaluée par Meridian Bioscience. Il incombe à l'utilisateur de valider la compatibilité des échantillons traités avec de tels réactifs avec les réactifs accompagnant le test MERIFLUOR.

PERFORMANCES DU TEST

Des expectorations et des produits du lavage broncho-alvéolaire ont été collectés dans trois hôpitaux, chez des patients suspectés d'avoir une pneumonie à *Pneumocystis carinii*. Tous les échantillons ont été contrôlés à l'aide du test MERIFLUOR Pneumocystis et par coloration histologique: Wright-Giemsa (DiffQuick™) ou imprégnation à l'argent de Gomori. Les échantillons de deux sites ont été également colorés avec un test d'immunofluorescence directe d'un concurrent. Les résultats des 65 échantillons inclus dans l'analyse sont montrés dans le tableau 1.

Tableau 1

Coloration histologique		Test concurrent	
+	-	+	-
44	1*	31	0
2	18	0	12

Sensibilité	96%
Spécificité	95%
Corrélation avec la coloration histologique	95%
Corrélation avec le test concurrent	100%

*Le produit de lavage broncho-alvéolaire de ce même patient obtenu 24 heures plus tard était positif à la fois à la coloration histologique et au test d'immunofluorescence, indiquant une sensibilité plus élevée du test MERIFLUOR Pneumocystis.

Les organismes suivants n'ont donné aucune fluorescence avec MERIFLUOR-Pneumocystis:

Aspergillus flavus, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium spp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Legionella pneumophila*, *Nocardia asteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Toxoplasma gondii*.

ESPAÑOL

MERIFLUOR[®]

Pneumocystis

Procedimiento de Inmunofluorescencia Directa para la detección de *Pneumocystis carinii* en muestras del tracto respiratorio

REF 222030

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

USO INDICADO

MERIFLUOR Pneumocystis es un procedimiento in vitro para la detección de quistes y trofozoítos de *Pneumocystis carinii* en frotis directos de muestras provenientes del tracto respiratorio.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

El organismo conocido con el nombre de *Pneumocystis carinii* es un hongo unicelular que causa neumonía que puede ser fatal en pacientes con compromiso severo del sistema inmune.^{1, 2} La evidencia disponible indica que la mayoría de los niños experimentan infección leve o subclínica por *P. carinii* y que el organismo puede persistir en un estado latente hasta que la reactivación ocurre después de un estado de inmunosupresión.^{1, 3} Hasta muy recientemente las poblaciones con el mayor riesgo de contraer infección han sido los niños prematuros, pacientes con enfermedades hematopoyéticas malignas o defectos de las inmunoglobulinas, y pacientes que reciben tratamientos inmunosupresores, por ejemplo cortico esteroides en pacientes tratados de cáncer, o para inmunosuprimirlos con el objeto de disminuir el rechazo de los trasplantes de órganos.^{1, 2, 4, 5, 6} Desde 1981 la susceptibilidad inherente de los individuos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), ha aumentado significativamente la prevalencia de la neumonía por *Pneumocystis*. Esta se desarrolla en un 60-85% de los pacientes con SIDA y por un amplio rango es la infección oportunista más frecuente en este grupo de pacientes.^{1, 7, 8}

Con el microscopio de luz es posible distinguir tres estados diferentes del ciclo de vida del *P. carinii*: trofozoíto, esporozoíto y quiste.^{1, 9} Los trofozoítos de 2-5 mm de diámetro son pleomorfos y tienden a acumularse juntos formando masas. Estos atraviesan una etapa de maduración para convertirse en quistes. El quiste que mide entre 5-8 mm de diámetro es la forma más fácilmente reconocible del *P. carinii*. Los quistes contienen hasta ocho esporozoítos en forma de media luna o pleomorfos, y de 1-2 mm de diámetro, los cuales tienden a amontonarse en masas dentro de un material de matriz extracelular.

Actualmente, el diagnóstico clínico de neumonía por *P. carinii* se basa en evidencia radiológica y observación microscópica de muestras respiratorias mediante técnicas noespecíficas.^{1, 9} Los métodos de tinción no específicos como por ejemplo el de nitrato de plata – meten amina y azul de Orto toluidina tiñen la pared de los quistes pero no tienen afinidad alguna por los trofozoítos o esporozoítos.^{1, 9} Alternativamente, los métodos de tinción de Wright Giemsa y de Gram tiñen los trofozoítos y esporozoítos, pero no las paredes de los quistes.^{1, 9} Debido a la naturaleza inespecífica de estos métodos de tinción, la identificación apropiada del organismo ha sido difícil.^{10, 13} La detección de *P. carinii* en los fluidos provenientes del lavado bronco-alveolar, esputo inducido y frotis de impresiones de tejido pulmonar han sido logradas mediante la técnica de inmunofluorescencia.^{11, 12, 13}

MERIFLUOR Pneumocystis provee un procedimiento de inmunofluorescencia directa que es sencillo, altamente específico para la identificación de quistes y trofozoítos de *P. carinii* en muestras respiratorias.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El test MERIFLUOR Pneumocystis utiliza el principio de inmunofluorescencia directa. El reactivo de detección contiene anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) dirigidos contra la pared celular y los antígenos de matriz de los quistes, esporozoítos y trofozoítos de *P. carinii*. Primero las láminas preparadas con material respiratorio son tratadas con el Reactivo de Detección, entonces los anticuerpos monoclonales se adhieren a los antígenos de *Pneumocystis* presentes en la muestra. Enseguida las láminas se enjuagan para remover los anticuerpos no ligados. Luego se montan con Medio de Montaje MERIFLUOR y se examinan para determinar la presencia de fluorescencia de color verde manzana o la morfología característica de los quistes de *P. carinii*, utilizando un microscopio de luz fluorescente. Tanto los esporozoítos como los trofozoítos y la matriz extracelular deben fluorescer. Además, el material de fondo presente en la muestra se tiñe con el colorante de contraste y aparece de color anaranjado a rojo.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.

- Reactivo de Detección - Anticuerpos monoclonales anti-*P. carinii* marcados con FITC en una solución tamponada que contiene proteína, Azul de Evans y 0,07% de azida de sodio.

2. **Líquido de Montaje** - Solución tamponada de glicerol que contiene un agente para prolongar la fluorescencia y 0,05% de azida de sodio.
3. **Láminas portaobjetos**
4. **Pipetas de transferencia**

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Láminas de Control Positivo para *P. carinii* de origen humano
2. Lámina Control Negativo para *P. carinii*
3. Centrífuga
3. Cámara húmeda
5. Botella surtidora de enjuague
6. Laminillas portaobjetos
7. Acetona de grado analítico (almacénese en un recipiente herméticamente cerrado para prevenir la absorción de agua).
8. Incubadora entre 35-37 C.
9. Agua desionizada o de chorro
10. Pipetas
11. Agente de licuefacción de esputo: "Dithiothreitol"
12. Microscopio de fluorescencia equipado con un sistema de filtros para isotiocianato de fluoresceína (FITC) con los siguientes parámetros: longitud de onda de Excitación de 490-500 nm y Filtro de Barrera de 510-530 nm.

PRECAUCIONES

1. Todos los componentes y reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. No mezcle reactivos de kits con diferente número de lote.
3. No use componentes del kit más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
4. Proteja el Reactivo de Detección de la exposición a la luz.
5. Todos los reactivos deben ser invertidos suavemente antes de ser usados.
6. Limpie las láminas portaobjetos antes de usarlas con etanol al 95%.
7. Las muestras de los pacientes pueden contener el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, por lo tanto, deben manejarse por personal con entrenamiento apropiado, y desecharse como un agente biológico peligroso. Utilice guantes desechables durante el manejo de las muestras y a través del procedimiento de la prueba.
8. No permita que la muestra se seque después de añadir el Reactivo de Detección.
9. En caso de que no se vea material de muestra al observar varios campos microscópicos de los pozos de las láminas, es posible que la muestra se haya perdido. Por lo general, esto es causado por un procedimiento de lavado muy vigoroso, fijación insuficiente de la muestra o limpieza inadecuada de la lámina.
10. El reactivo de Detección contiene Azul de Evans, que constituye un agente carcinogénico potencial. Evite su contacto con la piel, y en caso de que esto ocurra, enjuague el área donde ocurrió el contacto con agua en abundancia.

ADVERTENCIA: Los reactivos de este kit contienen azida de sodio que es un irritante de la piel. Evite el contacto de la piel con los componentes del kit. El desecho de reactivos que contienen azida de sodio dentro de cañerías de plomo o de cobre puede ocasionar la formación de azidas metálicas explosivas. Sin embargo, esto puede impedirse enjuagando con un volumen grande de agua.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

Se debe referir a los SDS, disponible en www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version), para las Frases de Peligro y Precaución.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad del kit MERIFLUOR Pneumocystis está indicada en la etiqueta del mismo. Para mantener un funcionamiento óptimo, el kit debería almacenarse entre 2-8 C y ser colocado de nuevo y con prontitud al refrigerador después de cada uso.

PRECAUCIÓN: NO CONGELAR

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de Lavado Broncoalveolar (BAL), Lavado Bronquial (BW) y Esputo Inducido (IS) deben ser recolectadas utilizando procedimientos estándar. El tratamiento previo de muestras con fijadores como por ejemplo formaldehído, paraformaldehído o etanol no es recomendable, ya que esto puede ocasionar una disminución o pérdida de la fluorescencia.

La siguiente tabla resume los tiempos en los cuales las muestras se pueden procesar adecuadamente con el test MERIFLUOR Pneumocystis:

	No preservado	Alrededor de 1 mes a 4 C
BAL/BW	Fijado con acetone en lámina	Tañir dentro de las siguientes 8 horas o congelar a -20 C por un término de hasta un mes
	Con o sin Digestión	1 día a 4 C
Esputo Inducido (IS)	Con Digestión y congelado	1-2 meses
	Fijado con acetone en lámina	Tañir dentro de las siguientes 8 horas o congelar a -20 C por un término de hasta un mes
Tejido	No fijado	Congele inmediatamente o haga una preparación en lamina y fijela con acetona

A. Preparación de muestras de BW y BAL

1. Método de centrifugación
 - a. Las muestras deben ser concentradas para aumentar la probabilidad de recuperación de *P. carinii*. Mezcle la muestra concienzudamente, transfiera un mínimo de 5 mL a un tubo de centrifuga y centrifugue a 1,800 xg durante 10 minutos. Remueva y deseche todo menos 0,5 mL de sobrenadante. Resuspenda cuidadosamente el sedimento en el resto 0,5 mL de fluido de sobrenadante.
 - b. Remueva entre 25-50 µL de la muestra resuspendida con una pipeta de transferencia (la marca más cercana a la punta es de 50 µL) y colóquela en el pozo adecuado de una lámina portaobjetos.
 - c. Extienda la muestra sobre el pozo usando el lado de la pipeta de transferencia.
 - d. Continúe inmediatamente con la tinción (vea el **PROCEDIMIENTO**)
2. Método Cytospin' 2 de Shandon
 - a. El procedimiento de concentración puede ser omitido centrifugando entre 0,5-0,6 mL de solución no concentrada de **BAL** o de **BW** a 900 rpm/5 minutos usando un filtro blanco y uno de color crema. La marca más cercana al manguito de la pipeta de transferencia (proporcionada con el kit) es la de 0,3 mL.
 - b. Continúe inmediatamente con la tinción (vea el **PROCEDIMIENTO**).

B. Preparación de muestras de Esputo Inducido (IS)

Las muestras de esputo inducido pueden ser procesadas preparando frotis del esputo directamente. Sin embargo, una recuperación mayor puede ser obtenida mediante concentración después de licuefacción del esputo con ditiotreitól.^{11, 13}

1. Frotis directos a partir de IS.
 - a. Con un aplicador delgado de madera separe hacia la periferia de la muestra todas las porciones opacas, blancas o de color crema de material presente en la muestra.
 - b. Remueva las porciones separadas en a) con una pipeta de transferencia, y colóquelas en el pozo adecuado de una lámina portaobjetos.
 - c. Esparza estas porciones y el material que ellas contienen sobre el pozo usando el lado de la pipeta de transferencia.
 - d. Continúe inmediatamente con la tinción (vea el **PROCEDIMIENTO**).

C. Preparación de muestras de Biopsias

Las muestras transbronquiales, de pulmón abierto, u otro material de biopsia no se deben fijar con formalina. Para su transporte, éstas deben colocarse dentro de un recipiente con gasa ligeramente humedecida con solución salina. El tejido no debe sumergirse en solución salina ni tampoco permitir que se seque ya que cualquiera de las dos puede resultar en frotis de impresiones histológicas inapropiadas.

1. Prepare una superficie recién cortada de un fragmento de tejido. Frote la superficie de la muestra cortada en una lámina portaobjetos apropiadamente marcada. Haga varias impresiones no superpuestas dentro del pozo con cuidado de no esparcir la muestra fuera del mismo. El uso de varias superficies de corte aumentará la incidencia de detección del microorganismo *P. carinii*.
2. Mientras que las impresiones aún estén húmedas en la lámina, fijelas añadiendo entre 1-2 gotas de acetona y permita que se sequen completamente. Proceda con el paso 2 de **PROCEDIMIENTO**.

PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO

Un control positivo debe ser incluido cada vez que el test se realiza. Para esto pueden usarse las muestras de lavado broncoalveolar o lavado bronquial que han sido previamente confirmadas como positivas para la presencia de *P. carinii*, y que no han sido tratadas con soluciones fijadoras como formaldehído, paraformaldehído o etanol. Prepare láminas Control como se describe en **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**. Las láminas que han sido fijadas con acetona pueden ser congeladas a -20 C por un período de hasta un mes. No es necesario repetir la fijación con acetona en muestras descongeladas. Las láminas Control también pueden ser obtenidas comercialmente. Las muestras de Control Positivo deben exhibir las características de tinción de una muestra positiva como se describe en **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Permita que la muestra se seque al aire; luego proceda a fijarla añadiendo dos gotas de acetona a cada muestra en la lámina, y deje secar al aire por completo. **NOTA: Las muestras deben ser analizadas en un término de ocho horas.**
2. Utilice una pipeta de transferencia diferente para colocar 50 mL de Reactivo de Detección en cada pozo de muestra y de control. Con la pipeta de transferencia eparza el reactivo sobre toda la superficie del pozo con cuidado de no tocar la muestra.
3. Incube la lámina en una cámara húmeda durante 30 minutos entre 35-37 C.
4. Sacuda la lámina ligeramente sobre una toalla de papel para remover el reactivo en exceso. Utilice una botella de lavado para enjuagar la lámina con un chorro suave de agua hasta que el exceso de Reactivo de Detección haya sido removido. **NOTA: No sumerja la lámina durante el enjuague.** Tenga cuidado durante el proceso de enjuague: enjuague con un chorro suave para no desprender la muestra y con cuidado de no rozarla con la botella de lavado, o de contaminar una muestra con otra.
5. Remueva el exceso de agua sacudiendo la lámina sobre una toalla de papel limpia. **NOTA: No permita que la lámina se seque.**
6. Añada una o dos gotas de Medio de Montaje a cada lámina y cúbrala con una laminilla.
7. Examine cada pozo cuidadosamente con un microscopio de luz fluorescente a una magnificación entre 200-300x. Proteja la lámina de la luz blanca. **NOTA:** La lámina debe ser leída inmediatamente. De otro modo, guárdela en un lugar oscuro a una temperatura entre 2-8 C y léala en un periodo de 24 horas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Resultado Positivo del test: cualquier muestra que contenga dos quistes típicos que presenten fluorescencia verde manzana y tengan morfología característica debe considerarse positiva para la presencia de *P. carinii*. Por lo general, los quistes, cada uno de 5-8 mm de diámetro son encontrados junto con trofozoítos en racimos que pueden variar de tamaño y pueden presentar o no estructuras que semejan un "panal de abejas". Algunos quistes fluorescen uniformemente a través de su estructura, mientras que otros pueden fluorescer principalmente en su periferia y producir una apariencia como de "panal de abejas" dentro de los racimos.^{12, 13} En caso de que los síntomas persistan y no se observen quistes, otra muestra debe ser obtenida y examinada.
2. Resultado negativo de la prueba: una muestra que no presenta la fluorescencia característica descrita anteriormente.

CONTROL DE CALIDAD

Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.

1. Debe obtenerse una muestra humana positiva para verificar el funcionamiento apropiado del kit.
2. En el momento de ser usados, los componentes del kit deben examinarse visualmente para determinar la presencia de signos obvios de contaminación, congelamiento o formación de grumos.

Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la faya. Si se repite la faya luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.

VALORES ESPERADOS

El test de inmunofluorescencia directa MERIFLUOR Pneumocystis identificará la presencia de *P. carinii* en muestras respiratorias. La incidencia de la infección por *P. carinii* varía entre hospitales y poblaciones de pacientes. La neumonía por Pneumocystis se desarrolla en un 60-85% de los pacientes con SIDA no tratados, pero por lo general su incidencia disminuye en aquellas poblaciones de pacientes que reciben quimioprofilaxis antimicrobiana.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El test MERIFLUOR Pneumocystis es un test diagnóstico in vitro para ayudar a diagnosticar la infección por *P. carinii*. La presencia de *P. carinii* está asociada con una neumonía en individuos inmunosuprimidos. Además, la presencia de quistes en una muestra no excluye la presencia de otros microorganismos o de otra enfermedad de fondo como el agente causal de los síntomas del paciente. El diagnóstico final deberá hacerlo un médico familiarizado con la historia del paciente, los resultados del examen físico y los datos de laboratorio. **NOTA:** Meridian Bioscience no ha evaluado si los agentes de licuefacción que son promovidos comercialmente son adecuados para tratar muestras de esputo que van a ser analizadas con el test MERIFLUOR Pneumocystis. Es responsabilidad del usuario validar la compatibilidad entre las muestras tratadas con esos agentes y los reactivos proporcionados como parte del test MERIFLUOR.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Muestras de esputo inducido y lavados broncoalveolares fueron recolectadas en tres hospitales a partir de pacientes que se sospechaba tenían neumonía por *Pneumocystis carinii*. Todas las muestras fueron teñidas con el kit MERIFLUOR Pneumocystis y con una tinción histológica: "Wright-Giemsa" (DiffQuick o con metenamina argéntica de Gomori). Muestras de dos centros de estudios también fueron teñidas con otro test comercial de inmunofluorescencia directa. Los resultados de las 65 muestras incluidas en el estudio se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

Tinción histológica		Ensayo de la competencia	
+	-	+	-
44	1*	31	0
2	18	0	12

Sensibilidad	96%
Especificidad	95%
Concordancia con la tinción histológica	95%
Concordancia con el test de la competencia	100%

* Un lavado broncoalveolar obtenido a partir de este paciente 24 horas después dio un resultado positivo tanto por histología como por tinciones de inmunofluorescencia. Esto último, indica de una mayor sensibilidad por parte del test MERIFLUOR Pneumocystis.

La siguiente lista de organismos obtenidos a partir de cultivos no presentaron reacción de fluorescencia al ser analizados con el test MERIFLUOR Pneumocystis:

Aspergillus flavus, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Legionella pneumophila*, *Nocardia asteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Toxoplasma gondii*

DEUTSCH

MERIFLUOR[®]

Pneumocystis

Direkter Immunfluoreszenz-Test auf *Pneumocystis carinii* in Proben aus dem Respirationstrakt

REF 222030

IVD In-vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

MERIFLUOR Pneumocystis ist ein In vitro Verfahren zum Nachweis von *Pneumocystis carinii*-Zysten und - Trophozoiten in direkten Ausstrichen von Proben aus dem Respirationstrakt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Pneumocystis carinii ist ein einzelliger Pilze, der bei stark immungeschwächten Patienten lebensbedrohliche Pneumonien auslöst.^{1, 2} Nach bisherigen Erkenntnissen machen die meisten Kinder eine milde oder subklinische Infektion mit *P. carinii* durch, wobei der Organismus in einem latenten Stadium überleben kann, bis es zu einer Reaktivierung in der Folge einer Immunsuppression kommt.^{1, 3} Bis vor kurzem waren die gefährdeten Populationen Frühgeborene, Patienten mit hämatopoetischen malignen Tumoren oder Immunglobulindefekten und Patienten, die eine immunsuppressive Therapie (z.B. mit Kortikosteroiden) wegen einer Krebserkrankung oder Organtransplantation erhalten.^{1, 2, 4, 5, 6} Seit 1981 hat die Anfälligkeit von AIDS-Patienten die Prävalenz von Pneumocystis-Pneumonie deutlich erhöht. Sechzig-85% der AIDS-Patienten entwickeln eine Pneumocystis-Pneumonie, sie ist damit die bei weitem am häufigsten opportunistische Infektion in dieser Gruppe.^{1, 7, 8}

Mit dem Lichtmikroskop sind drei Entwicklungsformen von *P. carinii* erkennbar: Trophozoit, Sporozoit und Zyste.^{1, 9} Die Trophozoiten sind 2-5 µm im Durchmesser groß, sind pleomorph und neigen dazu, in Massen zusammenzuklumpen. Trophozoiten unterliegen einem Reifeprozess zur Zyste. Die Zyste ist 5-8 µm im Durchmesser groß, sie ist die am einfachsten erkennbare Form von *P. carinii*. Zysten enthalten bis zu acht halbmondförmige oder pleomorphe Sporozoiten, die 1-2 µm im Durchmesser groß sind und dazu neigen innerhalb von extrazellulärem Matrixmaterial zusammenzuklumpen.

Derzeit basiert die klinische Diagnose einer Pneumonie durch *P. carinii* auf radiologischen Nachweisen und der direkten mikroskopischen Untersuchung von Proben aus dem Respirationstrakt mit unspezifischen Methoden.^{1, 9} Unspezifische Färbemethoden wie die Färbung mit Methenamin-Silbernitrat oder Toluidinblau, färben die Zystenwand, haben jedoch keine besondere Affinität zu Trophozoiten oder Sporozoiten.^{1, 9} Die Wright-Giemsa und die Gram Färbemethoden wiederum färben zwar Trophozoiten und Sporozoiten, jedoch nicht die Zystenwände.^{1, 9} Mit diesen unspezifischen Färbemethoden war eine klare Identifikation des Organismus bisher schwierig.^{10, 13} Der Nachweis von *P. carinii* aus bronchoalveolärer Lavage, aus induziertem Sputum und aus Ausstrichen von Lungengewebe gelang durch den Immunfluoreszenztest.^{11, 12, 13}

MERIFLUOR Pneumocystis ist ein einfaches hochspezifisches direktes Immunfluoreszenz-Verfahren, das *P. carinii*-Zysten und Trophozoiten in Proben aus dem Respirationstrakt identifiziert.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

MERIFLUOR Pneumocystis wendet das Prinzip der direkten Immunfluoreszenz an. Das Nachweis-Reagenz enthält FITC-markierte monoklonale Antikörper gegen Zellwände und Matrix-Antigene von *P. carinii*-Zysten, - Sporozoiten und - Trophozoiten. Vorbereitete Objektträger mit respiratorischen Proben werden mit dem Nachweisreagenz behandelt. Die monoklonalen Antikörper binden an die Pneumocystis-Antigene, die in der Probe vorhanden sind. Ungebundene Antikörper werden von den Objektträgern abgespült. Ein Deckglas wird mit MERIFLUOR-Eindeckmittel aufgebracht, und die Objektträger werden mit einem Fluoreszenzmikroskop auf die helle apfelgrüne Farbe und die charakteristische Morphologie von *P. carinii*-Zysten untersucht. Sporozoiten, Trophozoiten und die extrazelluläre Matrix sollten ebenfalls fluoreszieren. Das Hintergrundmaterial der Probe wird matt orange bis rot gegengefärbt.

REAGENZEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

1. **Nachweis-Reagenz** - FITC-markierte monoklonale Antikörper gegen *P. carinii* in einer gepufferten Proteinlösung mit 0,07% Natriumazid
2. **Eindeckmittel** - gepuffertes Glycerol mit einem Antiquencher und 0,05% Natriumazid
3. **Objektträger**
4. **Transfer-Pipetten**

BENÖTIGTE ABER NICH ENTHALTENE MATERIALIEN

1. *P. carinii* positive Kontroll-Objektträger menschlichen Ursprungs
2. *P. carinii* negative Kontroll-Objektträger
3. Zentrifuge

4. Feuchte Kammer
5. Waschflasche
6. Deckgläser
7. Aceton, Analysen-Qualität (in fest verschlossenem Behälter aufbewahren um die Absorption von Wasser zu vermeiden)
8. Inkubator (35-37 C)
9. Deionisiertes Wasser oder Leitungswasser
10. Pipetten
11. Dithiothreitol
12. Fluoreszenzmikroskop ausgestattet mit einem Filtersystem für Fluorescein-isothiocyanat (FITC) mit den folgenden Spezifikationen: Anregungswellenlänge 490-500 nm, Sperrfilter 510-530 nm

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die in-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Die Reagenzien von Test-Kits unterschiedlicher Chargennummern sollten nicht ausgetauscht werden.
3. Die Test-Kit-Bestandteile nicht nach dem Ablauf des Haltbarkeitsdatums, das auf dem Test-Kit-Etikett angegeben ist, verwenden.
4. Das Nachweis-Reagenz vor Licht schützen.
5. Alle Reagenzien sollten vor Gebrauch vorsichtig gemischt werden.
6. Objektträger vor Gebrauch mit Alkohol 95% reinigen.
7. Patienten-Proben können HIV oder andere Erreger enthalten und sollten von gut ausgebildetem Personal gehandhabt und als möglicherweise pathogen entsorgt werden. Einmalhandschuhe beim Umgang mit den Proben und bei der Testdurchführung tragen.
8. Die Probe nach der Zugabe des Nachweis-Reagenzes nicht austrocknen lassen.
9. Wenn in der Vertiefung des Objektträgers mit bloßem Auge kein Probenmaterial zu sehen ist, ist die Probe möglicherweise verloren gegangen. Dies kommt häufig vor, wenn der Objektträger zu kräftig gewaschen wird, wenn die Probe nicht ausreichend fixiert wurde oder wenn der Objektträger nicht ausreichend gereinigt wurde.
10. Das Nachweis-Reagenz enthält Evans Blue, das potentiell kanzerogen ist. Hautkontakt vermeiden. Bei Kontakt die betroffene Stelle sorgfältig waschen.

WARNUNG: Die Reagenzien dieses Test-Kits enthalten Natriumazid, das hautreizend wirkt. Hautkontakt mit den Test-Bestandteilen vermeiden. Das Entsorgen der Natriumazid-haltigen Reagenzien in Blei- oder Kupferrohrleitungen kann zur Bildung explosiver Metallazide führen. Durch Spülen mit großen Wassermengen während des Entsorgens kann dies vermieden werden.

GEFÄHRDUNGEN UND SICHERHEITSHINWEISE

Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind: www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version).

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Haltbarkeitsdatum des MERIFLUOR Pneumocystis wird auf dem Etikett des Test-Kits angegeben. Um optimale Ergebnisse zu erzielen sollte der Test-Kit bei 2-8 C gelagert werden und sofort nach jedem Gebrauch in den Kühlschrank zurückgelegt werden.

ACHTUNG: NICHT EINFRIEREN.

PROBENNAHME UND VORBEREITUNG

Proben von Bronchoalveolar-Lavage (**BAL**), Bronchial-Waschflüssigkeit (**BW**), und induziertem Sputum (**IS**) sollten nach Standardmethoden gewonnen werden. Die Vorbehandlung der Proben mit Fixiermitteln wie zum Beispiel Formaldehyd, Paraformaldehyd oder Ethanol wird nicht empfohlen, da dies eine Abnahme oder einen Verlust der Fluoreszenz Folge haben kann.

Folgende Tabelle fasst die Zeiträume zusammen, in denen die Proben haltbar und für eine Analyse mit dem MERIFLUOR Pneumocystis geeignet bleiben.

BAL/BW	Nicht Konserviert	Ca. 1 Monat bei 4 C
	Acetonfixiert auf dem Objektträger	Innerhalb von 8 Std. färben oder bei -20 C bis zu einem Monat einfrieren
Induziertes Sputum	Verdaut oder unverdaut	1 Tag bei 4 C
	Verdaut und eingefroren	1-2 Monate
	Acetonfixiert auf dem Objektträger	Innerhalb von 8 Std. färben oder bei -20 C bis zu einem Monat einfrieren
Gewebe	Nicht fixiert	Sofort einfrieren oder ein Kontaktpräparat, herstellen, auf dem Objektträger mit Acetonfixiert.

A. Vorbereitung von BW – und BAL – Proben

1. Zentrifugationsmethode
 - a. Proben sollten aufkonzentriert werden, um die Wiederfindungsrate von *P. carinii* zu erhöhen. Die Probe sorgfältig mischen, ein Minimum von 5 mL in ein Zentrifugenröhrchen geben und bei 1,800 xg 10 min. lang zentrifugieren. Den Überstand bis auf 0,5 mL entfernen und verwerfen. Den Niederschlag sorgfältig in den verbliebenen 0,5 mL Flüssigkeit aufsuspendieren.

- b. Entfernen 25-50 µL des resuspendierten Probe mit einer Transferpipette aufnehmen (die erste Markierung von der Spitze aus gesehen markiert 50 µL) und in die passende Vertiefung des Objektträgers geben.
 - c. Die Probe mit der Seite der Transferpipette über die Vertiefung ausbreiten.
 - d. Sofort mit dem Färben fortfahren (siehe **TESTDURCHFÜHRUNG**)
2. Shandon Cytospin™ 2 Methode
 - a. Die Schritte zum Aufkonzentrieren können entfallen, indem 0,5 – 0,6 mL der unkonzentrierten **BAL** oder **BW** bei 900 rpm 5 min. lang unter Verwendung eines weißen und eines gelbbraunen Filters zentrifugiert werden. Die erste Markierung vom Saugball der Transferpipette (mit dem Testkit mitgeliefert) aus gesehen markiert 0,3 mL.
 - b. Sofort mit dem Färben fortfahren (siehe **TESTDURCHFÜHRUNG**)

B. Vorbereitung von IS-Proben

Induzierte Sputum-Proben können durch direktes Ausstreichen aufbereitet werden. Die Wiederfindungsrate kann jedoch durch das Verflüssigen des Sputums mit Dithiothreitol^{11,13} und anschließendem Aufkonzentrieren erhöht werden.

1. Direkte Ausstriche von **IS**
 - a. Mit einem Holzspatel alle opaken, weißen oder sahnefarbigen Flocken aus der Probe am Rand sammeln.
 - b. Entfernen Sie die Flecken mit einer Transferpipette aufnehmen und in eine passende Vertiefung auf dem Objektträger geben.
 - c. Diese Flocken und das damit verbundene Material mit der Seite der Transferpipette über die Vertiefung ausbreiten.
 - d. Sofort mit dem Färben fortfahren (siehe **TESTDURCHFÜHRUNG**)

C. Vorbereitung von Biopsie-Material

Transbronchiale Proben, Proben von offenen Lungen oder andere Biopsieproben dürfen nicht mit Formalin fixiert werden. Die Probe in einem Behälter auf Gaze, die leicht mit Kochsalzlösung angefeuchtet wurde, transportieren. Das Gewebe sollte weder in Kochsalzlösung getaucht werden noch sollte es austrocknen, da beides zu Kontaktpräparaten von schlechter Qualität führt.

1. Einen frischen Schnitt auf einem Teil des Gewebes durchführen. Die angeschnittene Oberfläche der Probe auf einen ausreichend gekennzeichneten Objektträger drücken. Innerhalb der Vertiefung mehrere nicht-überlappende Abdrücke machen und dabei ein Verschmieren vermeiden. Die Verwendung mehrerer angeschnittener Oberflächen erhöht die Wahrscheinlichkeit *P. carinii* Organismen nachzuweisen.
2. Während die Abdrücke auf dem Objektträger noch feucht sind, sollten sie mit 1-2 Tropfen Aceton fixiert werden und an der Luft vollständig trocken. Mit Schritt 2 der **TESTDURCHFÜHRUNG** fortfahren.

VORBEREITUNG DER POSITIVEN KONTROLLE

Eine positive Kontrolle sollte bei jeder Testdurchführung mitlaufen. Bronchoalveoläre Lavage oder Bronchial-Waschlösung, die zuvor als *P. carinii*-positiv eingestuft worden waren und die nicht mit Fixiermitteln wie Formaldehyd, Paraformaldehyd oder Ethanol behandelt wurden, können verwendet werden. Kontroll-Objektträger werden wie unter **VORBEREITUNG DER PROBEN** beschrieben hergestellt. Objektträger, die mit Aceton fixiert wurden, können bei -20 C bis zu einem Monat lang eingefroren werden. Aufgetaute Objektträger müssen nicht noch einmal mit Aceton fixiert werden. Kontroll-Objektträger sind auch im Handel erhältlich. Positive Kontrollproben müssen die Farbcharakteristika einer positiven Probe wie unter **INTERPRETATION DER ERGEBNISSE** beschrieben aufweisen.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Die Proben an der Luft trocknen lassen, dann die Probe mit 1-2 Tropfen Aceton auf dem Objektträger fixieren und vollständig an der Luft trocknen lassen. **ACHTUNG: Proben müssen innerhalb von 8 Std. analysiert werden.**
2. Mit jeweils einer neuen Transferpipette 50 µL (Markierung, die der Spitze am nächsten ist) des Nachweis-Reagenzes in jede Proben- und Kontroll-Vertiefung geben. Mit der Transferpipette das Reagenz über die gesamte Vertiefung ausbreiten, und dabei darauf achten, dass die Probe nicht bewegt wird.
3. Den Objektträger in einer feuchten Kammer 30 min. lang bei 35-37 C inkubieren.
4. Den Objektträger leicht auf ein Papiertuch klopfen, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Mit einer Waschflasche den Objektträger mit einem sanften Wasserstrahl abspülen, bis überschüssiges Nachweisreagenz entfernt ist. **ACHTUNG: Den Objektträger während des Abspülens nicht eintauchen.** Während des Spülvorganges äußerst vorsichtig sein, um zu vermeiden, dass die Probe auf dem Objektträger wandert oder dass Kreuzkontaminationen der Proben auftreten.
5. Überschüssiges Wasser durch Klopfen des Objektträgers auf einem sauberen Papiertuch entfernen. **ACHTUNG: Den Objektträger nicht austrocknen lassen.**
6. 1-2 Tropfen Eindeckmedium auf jeden Objektträger geben und mit einem Deckgläschen abdecken.
7. Jede Vertiefung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop bei 200-300 facher Vergrößerung untersuchen. Den Objektträger vor Licht schützen. **ACHTUNG:** Der Objektträger sollte sofort untersucht werden. Wenn dies nicht möglich ist, den Objektträger bei 2-8 C im Dunkeln aufbewahren und innerhalb von 24 Std. untersuchen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

1. Positive Testergebnisse: Jede Probe, die zwei typische Zysten mit der apfelgrünen Fluoreszenz der charakteristischen Morphologie aufweist, sollte als *P. carinii*-positiv eingestuft werden. Im Allgemeinen werden Zysten (jede 5-8 µm im Durchmesser) zusammengeklumpt mit Trophozoiten gefunden. Diese Klumpen können verschieden groß sein und mit oder ohne "Honigwabenn"-ähnliche Strukturen auftreten. Einige Zysten fluoreszieren gleichmäßig in ihrer Struktur, wogegen andere Zysten hauptsächlich in ihrer Peripherie fluoreszieren und so eine "Honigwabenn"-Struktur innerhalb des Klumpens erzeugen.^{12,13} Wenn keine Zysten beobachtet werden und die Symptome aber bestehen bleiben, sollten andere Proben genommen und untersucht werden.

- Negative Testergebnisse: Eine Probe, die nicht die charakteristische Fluoreszenz wie oben beschrieben aufweist, ist negativ bezüglich *P. carinii*.

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. Zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

- Eine positive Kontrolle menschlichen Ursprungs sollte im Testlauf mitgeführt werden, um die Funktionsfähigkeit des Testkits zu überprüfen.
- Vor jedem Gebrauch sollten die Testkit-Bestandteile auf offensichtliche Anzeichen von Kontaminationen, Vereisungen oder Verklumpungen untersucht werden.

Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.

ERWARTETE WERTE

Der MERIFLUOR Pneumocystis – Test ist ein direkter immunfluoreszenz-Test, der das Vorkommen von *P. carinii* in Proben aus dem Respirationstrakt nachweist. Die Inzidenz von *P. carinii*-Infektionen variiert zwischen den Krankenhäusern und den Patientenpopulationen. Pneumozystosen entwickeln sich in 60-85% von unbehandelten AIDS-Patienten; diese Rate ist wahrscheinlich jedoch niedriger in Populationen, die eine prophylaktische antimikrobielle Therapie erhalten.

EINSCHRÄNKUNGEN

Der MERIFLUOR Pneumocystis – ist ein diagnostischer In-vitro Test, der, die Diagnose von *P. carinii*-Infektionen unterstützen soll. Das Vorkommen von *P. carinii* geht bei immunsupprimierten Patienten mit Pneumonien einher. Hinzu kommt, dass das Vorkommen von Zysten in einer Probe nicht das Vorliegen anderer Mikroorganismen oder anderer zugrunde liegender Krankheitszustände als Ursache für die Symptome des Patienten ausschließt. Die Enddiagnose sollte von einem Arzt gestellt werden, der vertraut ist mit der Krankengeschichte des Patienten, den Ergebnisse der ärztlichen Untersuchung, und den Labordaten. HINWEIS: Meridian Bioscience hat die Eignung kommerziell erhältlicher Reagenzien zur Verflüssigung von Sputum zur Behandlung von Proben die mit MERIFLUOR Pneumocystis untersucht werden sollen, nicht überprüft. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders die Kompatibilität von mit solchen Reagenzien behandelten Proben mit den gelieferten Reagenzien des MERIFLUOR Testsystems zu überprüfen.

LEISTUNGSMERKMALE

Proben von induziertem Sputum und bronchoalveolärer Lavage wurden in drei Krankenhäusern von Patienten mit Verdacht auf eine *Pneumocystis carinii* – Pneumonie entnommen. Alle Proben wurden mit dem MERIFLUOR Pneumocystis-Testkit und mit einer histologischen Färbung – Wright-Giemsa (Diff-Quick™) oder Gomori Methenamin-Silber – gefärbt. Die Proben von zwei Standorten wurden außerdem mit einem direkten Immunfluoreszenz-Testkit der Konkurrenz gefärbt. Die Ergebnisse der 65 analysierten Proben sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1

	Histologische Färbung		Konkurrenz-Test	
	+	-	+	-
MERIFLUOR Pneumocystis	44	1*	31	0
	2	18	0	12

Sensitivität	96%
Spezifität	95%
Übereinstimmung mit histologischer Färbung	95%
Übereinstimmung mit Konkurrenz-Test	100%

*Ein Probe von bronchoalveolärer Lavage, die 24 Stunden später von demselben Patienten entnommen wurde, war sowohl histologisch als auch mit der Immunfluoreszenz-Färbung positiv, was auf eine erhöhte Sensitivität des MERIFLUOR Pneumocystis-Tests hinweist.

Die folgenden Organismen aus Kulturen zeigten keine Fluoreszenz im MERIFLUOR Pneumocystis:

Aspergillus flavus, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tropicalis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium* spp., *Histoplasma capsulatum*, *Legionella pneumophila*, *Nocardia asteroides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis glabrata*, *Toxoplasma gondii*

REFERENCES

- MacFarlane, JT and RG Finch, Pneumocystis carinii pneumonia 1985; Thorax 40: 561-570.
- Walzer, PD, DP Perl, DJ Krogstad, PG Rawson, and MG Schultz. Pneumocystis carinii pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic and clinical features. Ann.Intern.Med 1974; 80:83-93.
- Stagno, S., LL Pifer, WT Hughes, DM Brasfield and RE Tiller. Pneumocystis carinii pneumonia in young immunocompetent infants. Pediatrics 1980; 66:56-62.
- Hughes, WT, RA Price, H Kim, TP Coburn, D Girgsby and S Feldman. Pneumocystis carinii pneumonia in children with malignancies. J.Pediatr.1973; 82:404-415.
- Pifer, LL, HB Niell, BJ Morrison, JD Counce, Jr, JM Freeman, DR Woods and CL Neely. Pneumocystis carinii antigenemia in adults with malignancy, infection, or pulmonary disease. J.Clin.Microbiol 1984; 20:887-890.

- Hardy, AM, CP Wajszczuk, AF Suffredini, TR Hakala and M Ho. Pneumocystis carinii pneumonia in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and steroids. J.Infect.Dis. 1984; 149:143-147.
- Brenner, M, FP Ognibene, EE Lack, JT Simmons, AF Suffredini, HC Lane, AS Fauci, JE Parrillo, JH Shelhamer and H Masur. Prognostic factors and life expectancy of patients and acquired immunodeficiency syndrome and Pneumocystis carinii pneumonia. Am.Rev.Respir.Dis. 1987; 136:1199-1206.
- Posner, D and FA Kahn. Respiratory infection in AIDS: A comprehensive care approach. J.Respir.Dis. 1987; 8:83-94.
- Hughes, WT In Pneumocystis carinii Pneumonitis. Vol 1&2 CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1987; p 9-32.
- Milder, JE PD Walzer, JD Coonrod and ME Rudledge. Comparison of histological and immunological techniques for detection of Pneumocystis carinii rat bronchial lavage fluid. J.Clin.Microbiol. 1980; 11:409-417.
- Lim, SK, WC Eveland and RJ Porter. Direct fluorescent-antibody method for the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonitis from sputa or tracheal aspirates from humans. Appl.Microbiol. 1974; 27:144-149.
- Gill, VJ, G Evans, F Stock, JE Parrillo, H Masur and JA Kovacs. Detection of Pneumocystis carinii by fluorescent antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. J.Clin.Microbiol. 1987;25:1837-1840.
- Kovacs, JA, V Ng, H Masur, G Leoung, WK Hadley, G Evans, HC Lane, FP Ognibene, J Shelhamer, JE Parrillo and VJ Gill. Diagnosis of Pneumocystis carinii: Improved detection in sputum using monoclonal antibodies. N.Eng.J.Med. 1988; 318:589-593.



SN11060

REV. 08/14



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
USA, Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: (513) 271-3700
Orders/Customer Service:
(800) 543-1980
Technical Support Center:
(800) 343-3858
Information Fax:(513) 272-5432
Ordering Fax:(513) 271-0124

Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v.
Avenue du Japon, 2
1420 Braine l'Alleud
Belgium
Tel.: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
e-mail: info.bn@meridianbioscience.eu



Authorized Representative











Meridian Bioscience Europe
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese (MI)
Italy
Tel.: +39 0331 433636
Fax: +39 0331 433616
e-mail: info@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France
34, rue de Ponthieu
75008 Paris
France
Tel.: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
e-mail: info.fr@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symbols, Guia de simbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostico in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampon de Réaction / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stoplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampon de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tamponne / Solution tamponnée / Tampon / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampon de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
		DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de detección / Nachweis Reagenz

For technical assistance, call Technical Support Services at 800-343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at 800-543-1980.