



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®

CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA

Direct immunofluorescent detection procedure for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in fecal material

REF 250050

IVD In vitro diagnostic medical device

INTENDED USE

MERIFLUOR *Cryptosporidium*/Giardia (MERIFLUOR C/G) is an in vitro direct immunofluorescent detection procedure for the simultaneous detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in fecal material.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Cryptosporidium:

Protozoans of the genus *Cryptosporidium* are encountered worldwide and produce a self-limiting gastroenteritis in immunocompetent individuals. The primary symptoms include explosive, watery diarrhea, accompanied by vomiting, abdominal cramping, and low grade fever lasting two to fourteen days.^{1, 2} In immunocompromised patients, symptoms are more severe and persistent and may result in mortality particularly in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome.^{1, 2} Attempts to find effective chemotherapeutic agents have been unsuccessful thus far.

Cryptosporidium spp. have been found in a variety of domestic animals as well as poultry, calves, lambs, and goats. The first isolation of *Cryptosporidium* from a human was reported in 1976. Although several species have been described, little host specificity has been indicated.^{1, 2} The organism is a small, 2-6 micron, coccidian. The parasite undergoes its life cycle within the microvillous border of the intestine, although its occurrence in other sites has been reported.^{1, 2} The infective oocysts are excreted in feces from the host. Fecal-oral contamination is the most likely route of transmission.^{1, 2}

Early diagnosis of cryptosporidiosis using fecal material may eliminate the need for invasive procedures and facilitate supportive measures. Although various methods for the detection of oocysts in feces have been described, modified acid-fast staining is the most common procedure performed.¹ The acid-fast nature of the oocyst makes it difficult to differentiate from other noncryptosporidial acid-fast organisms of comparable size.

Giardia:

Giardiasis is one of the most common intestinal parasitic infections in the world.³ Contaminated food, untreated surface-water polluted with cyst-containing animal feces in conjunction with inadequate filtration in water treatment facilities are the primary sources.^{3, 4} In addition, public health authorities include giardiasis as a sexually transmitted disease.³

Organisms of the genus *Giardia* were first observed in 1675 by Antony van Leeuwenhoek.³ *Giardia* sp. are protozoan flagellates which exist in two forms: 1) a mobile and actively feeding trophozoite (9-21 µm long and 5-15 µm wide) found on the surface of the small intestine; 2) an infective oval-shaped cyst form which is smaller (8-12 µm long and 7-10 µm wide) and contains two to four nuclei.^{3, 4}

Clinical manifestations of *Giardia* infection range from asymptomatic cyst-passing with only mild gastrointestinal complaints to severely acute cases involving explosive, watery and foul-smelling diarrhea with abdominal cramps as well as bloating, flatulence, anorexia and nausea.^{3, 4} Though some cases present a self-limiting condition, symptoms of an acute or subacute infection may persist for several days to several months.^{3, 4} Therapeutic drug treatment using quinacrine hydrochloride, metronidazole, and furazolidone has been recommended for asymptomatic cyst-passers as well as symptomatic patients.^{3, 4}

Clinical diagnosis of giardiasis is routinely accomplished by direct microscopic examination of stool or stool concentrates for the presence of cysts and/or trophozoites. Conventional staining methods yield a sensitivity rate of 50-70%; lower rates have been observed when cysts were present at low levels.^{4, 5} Examination of duodenal and jejunal fluid aspirates and small intestine biopsy specimens have been used to improve conventional sensitivity rates but they are invasive and costly. Other methods include serodiagnosis by immunofluorescence and enzyme immunoassay procedures, however, neither technique indicates an active *Giardia* infection.^{4, 5}

An association between *Cryptosporidium* and *Giardia* infection has not been demonstrated. However numerous incidents of coinfection with both organisms have been documented.⁶

The **MERIFLUOR C/G** direct immunofluorescent detection procedure rapidly and accurately detects *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in clinical specimens. The specificity of monoclonal antibodies to *Cryptosporidium* and *Giardia* is combined with the sensitivity of the direct immunofluorescent assay format. The immunofluorescent technique is simple to perform and has been demonstrated to have a higher sensitivity than traditional staining procedures.^{7, 8}

BIOLOGICAL PRINCIPLES

MERIFLUOR C/G utilizes the principle of direct immuno-fluorescence. The Detection Reagent contains a mixture of FITC labeled monoclonal antibodies directed against cell wall antigens of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. A prepared fecal specimen is treated with the Detection Reagent and a Counterstain. The monoclonal antibodies attach to *Cryptosporidium* or *Giardia* antigens present in the specimen. The slides are rinsed to remove unbound antibodies, a coverslip is affixed with Mounting Medium, and the slides are examined for apple green color and characteristic morphology of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts using a fluorescent microscope. Background material in the specimen is counterstained dull 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-*Cryptosporidium* and anti-*Giardia* monoclonal antibodies in a buffered solution containing a protein stabilizer and 0.1% sodium azide.
- Counterstain:** Eriochrome Black solution.
- 20X Wash Buffer:** Concentrated wash buffer with a preservative.
- Positive Control:** Formalinized stool preparation of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts containing 0.09% thimerosal.
- Negative Control:** Formalinized stool containing 0.09% thimerosal.
- Mounting Medium:** Buffered glycerol containing formalin, an anti-quencher and 0.05% sodium azide.
- Transfer Loops**
- Treated Slides**

*NOTE: These reagents contain formaldehyde, which is a potential cancer hazard.

MATERIALS NOT PROVIDED

- Distilled or deionized water
- Wash bottle
- Humidity chamber
- Microscope slide coverslips (22 x 50 mm), #1 thickness
- Fluorescent microscope equipped with a filter system for fluorescein isothiocyanate (FITC) with the following parameters: Excitation wavelength: 490-500 nm, Barrier filter: 510-530 nm.
- Applicator sticks

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 and Counterstain from exposure to light.
- All reagents should be mixed thoroughly before use.
- Replace the reagent vial caps on their respective vials.
- When distributing specimens or reagents onto the slide wells use care not to scratch the treated surface with the loop or applicator stick.
- The Mounting Medium, Positive Control, and Negative Control contain formaldehyde, which is an irritant. Avoid contact with skin or clothing. If contact occurs, thoroughly flush area with water.
- The Positive Control contains formalin killed *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts, however, it should be handled as a potentially infectious specimen.
- The positive and negative controls contain formaldehyde which is a potential cancer hazard.
- 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 patient specimens and performing the test procedure.
- Specimens preserved in PVA or MF/MIF are not suitable for use with **MERIFLUOR C/G**. Formalin, SAF and EcoFix® preserved specimens may be used.
- If stool 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 or insufficient specimen drying time.

WARNING: Some reagents in this kit contain sodium azide which is a skin irritant and harmful if swallowed. Avoid skin contact with reagents. 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 during such disposal.

RISK AND SAFETY PHRASES

COUNTERSTAIN: TOXIC — DIMETHYLFORMAMIDE

RISK PHRASES:

- 61 May cause harm to the unborn child.

SAFETY PHRASES:

- 45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (Show label where possible).
53 Avoid exposure — obtain special instructions before use.

DETECTION REAGENT: HARMFUL — SODIUM AZIDE

RISK PHRASES

- 22 Harmful if swallowed
32 Contact with acids liberates very toxic gas

20X WASH BUFFER: HARMFUL — SODIUM O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

RISK PHRASES

- 33 Danger of cumulative effects
20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed

SAFETY PHRASES

- 36/37 Wear suitable protective clothing & gloves

NEGATIVE CONTROL, POSITIVE CONTROL: HARMFUL — FORMALDEHYDE / SODIUM O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

RISK PHRASES:

- 33 Danger of cumulative effects
- 40 Limited evidence of a carcinogenic effect.
- 43 May cause sensitization by skin contact.
- 20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed

SAFETY PHRASES:

- 36/37 Wear suitable protective clothing & gloves.

MOUNTING MEDIUM – HARMFUL - FORMALDEHYDE

RISK PHRASES:

- 40 Limited evidence of a carcinogenic effect.
- 43 May cause sensitization by skin contact.

SAFETY PHRASES:

- 36 Wear suitable protection clothing
- 37 Wear suitable gloves.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date of the **MERIFLUOR C/G** 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.**

REAGENT PREPARATION

1. Bring the entire kit to room temperature before use.
2. Prepare 1X wash buffer as needed. For example: 2.5 mL of 20X wash buffer + 47.5 mL of distilled or deionized water. Unused 1X wash buffer can be stored at room temperature up to three months.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. Stool specimens preserved in 10% formalin, sodium acetate-acetic acid-formalin (SAF) or EcoFix should be used. The preservative-stool mixture must be allowed to stand for a minimum of 30 minutes at RT to ensure adequate fixation. **MERIFLUOR C/G** is designed for use with the Para-Pak® line of parasitology products. Collect the specimen as directed by the appropriate Para-Pak package insert supplied with the collection system. Complimentary Para-Pak Formalin or SAF package inserts can be supplied by Meridian Bioscience, Inc., Technical Support Center. Please call 1-800-343-3858.
2. To increase the probability of detection in stools with low numbers of cysts or oocysts, the specimen may be concentrated prior to processing (see **SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS**). The Para-Pak® Macro-CON® and Para-Pak® CON-Trate® Systems are recommended for this purpose. The removal of fecal lipids by ethyl acetate may be particularly beneficial if the fecal specimen is mucoid. Dilipidation will facilitate the adherence of fecal material to the treated microscope slide.

TEST PROCEDURE

1. Use a transfer loop to transfer a drop of fecal material to a treated slide well. Spread the specimen over the entire well. Do not scratch the treated surface of the slide.
2. Use a new transfer loop to transfer a drop of Positive Control to a separate treated slide well. Spread the Positive Control over the entire well. Do not scratch the treated surface of the slide.
3. Use a new transfer loop to transfer a drop of Negative Control to a separate treated slide well.
4. Allow the slides to air dry completely at room temperature (usually requires 30 minutes).
5. Place one drop of Detection Reagent in each well.
6. Place one drop of Counterstain in each well.
7. Mix the reagents with an applicator stick and spread over the entire well. Do not scratch the treated surface of the slide.
8. Incubate the slides in a humidified chamber for 30 minutes at room temperature. **Note: Protect from light.**
9. Use a wash bottle to rinse the slides with a gentle stream of 1X Wash Buffer until excess Detection Reagent and Counterstain is removed. **Note: Do not submerge the slides during rinsing.** Avoid disturbing the specimen or causing cross contamination of the specimens.
10. Remove excess buffer by tapping the long edge of the slide on a clean paper towel. **Note: Do not allow slide to dry.**
11. Add one drop of Mounting Medium to each well and apply a coverslip.
12. Scan each well thoroughly using 100-200X magnification. The presence of *Cryptosporidium* oocysts should be confirmed at higher magnification.

INTERPRETATION OF RESULTS

Control Reactions:

1. *Cryptosporidium* oocysts are round to slightly oval in shape, 2-6 µm in diameter. The oocyst wall will stain bright apple green. A suture line may also be visible.
2. *Giardia* cysts are oval-shaped organisms, 8-12 µm long. The cyst wall will stain bright apple green.
3. Background material should counterstain dull orange to red.
4. The negative control well should not exhibit apple green fluorescence of characteristic cyst or oocyst morphology.
5. Some background coloration may sometimes result as an artifact of slide preparation. This background fluorescence is easily discernable by its lack of vibrant, apple green color or characteristic morphology of the cyst.

Patient Specimens:

1. **Cryptosporidium positive test result:** Any stool specimen exhibiting one or more oocysts with an apple green color and characteristic morphology should be considered positive for the presence of *Cryptosporidium* sp.
2. **Giardia positive test result:** Any stool specimen exhibiting one or more cysts with an apple green color and characteristic morphology should be considered positive for the presence of *Giardia*.
3. **Negative test result:** A stool specimen with no apple green fluorescence should be considered negative for the presence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. Background fluorescent debris which does not exhibit vibrant apple green color or characteristic morphology should also be considered negative.

QUALITY CONTROL

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

To provide quality control of the reagents contained in the kit, the Positive and Negative Controls should be evaluated each time a patient specimen is tested. **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 the Meridian Technical Services Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.**

At the time of each use, the kit components should be visually examined for obvious signs of contamination, freezing, or leakage.

It is suggested that the results of each quality control check be recorded in an appropriate log book to maintain high quality testing procedures and comply with regulatory agencies.

EXPECTED VALUES

The **MERIFLUOR C/G** direct immunofluorescent test will identify the presence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in stool specimens. Typically, patients in either active disease state shed oocysts or cysts, respectively, in moderate to large numbers. Some patients may continue to excrete oocysts or cysts in small numbers after complete clinical recovery.^{2,4} Variations in the rate of positivity may be expected due to age, location, and general health conditions of the patient population under study.^{1,3}

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

MERIFLUOR C/G is an in vitro diagnostic procedure to aid in the diagnosis of *Cryptosporidium* and *Giardia* infection. While the presence of *Cryptosporidium* or *Giardia* is often associated with diarrhea and vomiting, shedding of oocysts or cysts by asymptomatic individuals has been observed.^{1,4} In addition, the presence of oocysts or cysts in a stool specimen does not preclude the existence of other microorganisms or another underlying condition as the causative agent of a patient's symptoms. For these reasons appropriate concurrent testing for other etiologic agents should be considered.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Stool specimens preserved in 10% Formalin were received from several reference labs and tested in a blind study. Specimens were concentrated by the Para-Pak® CON-Trate® System and stained with **MERIFLUOR C/G** (DFA), **MERIFLUOR Cryptosporidium** (IFA), **MERIFLUOR Giardia** (IFA), hot modified acid-fast, and iodine.

1. Cryptosporidium

The following tables compare the results of the various staining procedures for *Cryptosporidium* oocysts in 115 stools. For specimens containing numerous oocysts, positive results were obtained by the three relevant staining procedures. For the 15 specimens with discrepant results, low numbers of oocysts were observed by the positive staining method. To resolve the discrepant results, these specimens were stained twice more by each method.

	Acid Fast		Resolved			IFA		Resolved	
	+	-	+	-		+	-	+	-
DFA +	24	13	32	5	DFA +	36	1	37	0
DFA -	2	76	1	77	DFA -	0	78	0	78

Sensitivity	92%	97%	Sensitivity	100%	100%
Specificity	85%	94%	Specificity	99%	100%
Correlation	87%	95%	Correlation	99%	100%

2. Giardia

The following tables compare the results of the various staining procedures for *Giardia* cysts in 115 concentrated stool specimens. For the six specimens with discrepant results, low numbers of cysts were observed by the positive staining method. To resolve the discrepant results, these specimens were stained by the trichrome staining method using a paired PVA preserved specimen.

	Iodine		Resolved			IFA		Resolved	
	+	-	+	-		+	-	+	-
DFA +	38	4	42	0	DFA +	42	0	42	0
DFA -	2	71	0	73	DFA -	0	73	0	73

Sensitivity	95%	100%	Sensitivity	100%	100%
Specificity	95%	100%	Specificity	100%	100%
Correlation	95%	100%	Correlation	100%	100%

3. Nonconcentrated Stools

Specimens were stained with **MERIFLUOR C/G** direct from the formalin vial or after concentration. Two of the 32 specimens positive for *Cryptosporidium* in concentrated stool were negative in the nonconcentrated sample. In both instances few oocysts were observed in the concentrated sample. There was total agreement with 40 *Giardia* positive specimens.

CROSSREACTIVITY

The following organisms did not fluoresce when tested with **MERIFLUOR C/G**.⁸
Blastocystis hominis, *Candida albicans*, *Chilomastix mesnili*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*

ITALIANO

MERIFLUOR®

CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA

Test in immunofluorescenza diretta per la ricerca simultanea di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia*, nei campioni fecali.

REF 250050

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

FINALITÀ D'USO

MERIFLUOR *Cryptosporidium*/*Giardia* (MERIFLUOR C/G) è un test in vitro di immunofluorescenza diretta per la ricerca simultanea di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia*, nei campioni fecali.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Cryptosporidium:

I Protozoi del genere *Cryptosporidium* hanno una distribuzione mondiale e causano una gastroenterite auto-limitante nei soggetti immunocompetenti. La sintomatologia comprende diarrea, accompagnata da vomito, crampi addominali e lieve rialzo termico della durata variabile di 2-14 giorni.^{1,2} Nei pazienti immunodepressi i sintomi sono molto più gravi e persistenti e l'infezione può essere fatale, soprattutto per i pazienti affetti da Sindrome da Immundeficienza Acquisita.^{1,2} Ad oggi i tentativi di trovare una terapia efficace sono risultati vani.

Cryptosporidium spp. è stato isolato in un gran numero di animali domestici quali pollame, vitelli, agnelli e capre. Il primo isolamento di *Cryptosporidium* nell'uomo è stato segnalato nel 1976. Sebbene siano state descritte molte specie, non è stata segnalata alcuna specificità per i vari ospiti.^{1,2} Il microrganismo è classificato come coccidio e le sue dimensioni sono assai ridotte: 2-6 µm. Il ciclo vitale si compie all'interno dello strato dei microvilli delle cellule intestinali, sebbene sia stato segnalato anche in altri distretti anatomici.^{1,2} Le oocisti infettive vengono escrete con le feci, per cui la via di infezione più frequente è quella oro-fecale.^{1,2}

La diagnosi precoce della criptosporidiosi partendo da campioni fecali può eliminare la necessità di sottoporre il paziente a indagini diagnostiche invasive. Sebbene siano stati descritti vari metodi, la colorazione di acido-resistenza è quella più comunemente utilizzata; tuttavia, tale tecnica manca di specificità, poiché è molto difficile differenziare *Cryptosporidium* da altri microrganismi acido-resistenti di dimensioni paragonabili eventualmente presenti.

Giardia:

La giardiasi è una delle parassitosi intestinali più frequenti a livello mondiale.³ I cibi contaminati, le acque superficiali inquinate da feci di animali contenenti cisti, così come una insufficiente filtrazione delle acque presso gli acquedotti rappresentano le principali fonti di infezione.^{3,4} Inoltre, le autorità sanitarie americane includono la giardiasi tra le malattie sessualmente trasmissibili.³

I microrganismi del genere *Giardia* sono stati osservati per la prima volta nel 1675 da Antony van Leeuwenhoek.³ *Giardia* sp. è un protozoo flagellato caratterizzato da due forme vitali: 1) un trofozite mobile, flagellato che si nutre attivamente (lungo 9-21 µm, largo 5-15 µm) e che viene osservato sulla mucosa intestinale (soprattutto duodenale); 2) una cisti infettante, ovale, di dimensioni minori (lunga 8-12 µm, larga 7-10 µm), contenente da 2 a 4 nuclei.^{3,4}

La sintomatologia clinica dell'infezione da *Giardia* varia dall'emissione asintomatica delle cisti, con un malessere gastrointestinale di lieve entità, ad una diarrea profusa, maleodorante ed acquosa, accompagnata da crampi addominali, meteorismo, flatulenza, anoressia e nausea.^{3,4} Sebbene alcuni casi si risolvano spontaneamente, i sintomi dell'infezione acuta o sub-acuta possono persistere per periodi variabili da parecchi giorni a parecchi mesi.^{3,4} La terapia farmacologica consigliata prevede la somministrazione di cloruro di quinacrina, metronidazolo e furazolidone sia per i pazienti asintomatici che eliminano le cisti sia per quelli sintomatici.^{3,4}

La diagnosi clinica della giardiasi viene effettuata mediante osservazione microscopica delle feci, previa concentrazione, per evidenziare la presenza di cisti e/o di trofoziti. I metodi tradizionali di colorazione forniscono una sensibilità variabile (50-70%): tale dato diminuisce ulteriormente se le cisti sono presenti in numero limitato.^{4,5} Le metodiche di esame degli aspirati duodenali o intestinali, nonché delle biopsie consentono di migliorare la sensibilità dei metodi convenzionali, ma risultano assai costose ed invasive. Altri test comprendono la sierodiagnosi in immunofluorescenza o in immunoenzimatica: nessuna delle due tecniche, però, è in grado di identificare una giardiasi in fase acuta.^{4,5}

Non è stata dimostrata alcuna associazione tra le infezioni da *Cryptosporidium* e *Giardia* nello stesso paziente, tuttavia sono stati osservati numerosi casi di co-infezione con entrambi i microrganismi.⁶

MERIFLUOR C/G è un test in immunofluorescenza diretta, altamente specifico, per la ricerca delle oocisti di *Cryptosporidium* e delle cisti di *Giardia* nei campioni fecali. La specificità degli anticorpi monoclonali diretti contro *Cryptosporidium* e *Giardia* si associa alla sensibilità del test in immunofluorescenza diretta. La tecnica di immunofluorescenza è assai semplice da eseguire e si è dimostrata più sensibile rispetto ai metodi tradizionali di colorazione.^{7,8}

PRINCIPI BIOLOGICI

MERIFLUOR C/G è basato su una tecnica di immunofluorescenza diretta. Il Reagente di identificazione contiene una miscela di anticorpi monoclonali (marcati con fluoresceina, FITC) diretti contro antigeni della parete cellulare delle oocisti di *Cryptosporidium* e delle cisti di *Giardia*. Gli strisci di materiale fecale opportunamente preparati sono trattati con il Reagente di identificazione e con il colorante di contrasto: gli anticorpi monoclonali si legano agli antigeni di *Cryptosporidium* e di *Giardia* 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 color verde-mela e la tipica morfologia delle oocisti di *Cryptosporidium* e delle cisti di *Giardia*. Il resto del vetrino ed il materiale estraneo 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 Diretto:** Anticorpi monoclonali anti-oocisti di *Cryptosporidium* ed anti-cisti di *Giardia* marcati con FITC, diluiti in soluzione proteica tamponata, contenente sodio azide allo 0,1%.
- Colorante di Contrasto:** Soluzione contenente nero Eriocromo.
- Soluzione di Lavaggio 20X:** Soluzione di lavaggio 20 volte concentrata, contenente un conservante.
- Controllo Positivo*:** Sospensione fecale contenente oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia* fissate in formalina contenente thimerosal allo 0,09%.
- Controllo Negativo*:** Sospensione fecale in formalina contenente thimerosal allo 0,09%.
- Liquido di Montaggio:** Fluido di montaggio composto da glicerolo tamponato contenente formalina, un agente inibitore del fotodecadimento e da sodio azide allo 0,05%.
- Anse calibrate monouso**
- Vetrini trattati per immunofluorescenza**

***NOTA:** Questi reagenti contengono formaldeide che è potenzialmente cancerogena.

MATERIALI NON FORNITI

- Acqua distillata o deionizzata.
- Spruzzetta per i lavaggi.
- Camera umida.
- Vetrini coprioggetto (22 x 50 mm), spessore 1
- Microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtro per Fluoresceina IsoTioCianato (FITC) con i seguenti parametri: lunghezza d'onda di eccitazione: 490-500 nm, Filtro: 510-530 nm.
- Bastoncini di legno.

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono destinati esclusivamente ad uso diagnostico in vitro.
- Non mescolare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Non usare reagenti scaduti. La data di scadenza è indicata sull'etichetta esterna.
- Proteggere il Reagente di identificazione ed il Colorante di contrasto dalle fonti di luce.
- Mescolare bene, ma delicatamente tutti i reagenti prima dell'uso.
- Richiudere i flaconi con i tappi corrispondenti.
- Quando si distribuiscono i campioni o i reagenti sul vetrino bisogna evitare di graffiare la superficie trattata con l'ansa o con il bastoncino di legno.
- Il Liquido di montaggio ed il Controllo Positivo e Negativo contengono formaldeide, che è considerata irritante. Evitare il contatto con la cute o con i vestiti. Se ciò si verifica, lavare accuratamente con acqua corrente.
- Il Controllo Positivo contiene oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia* inattivate in formalina, tuttavia deve essere maneggiato come materiale potenzialmente infettivo.
- Il Controllo Positivo e Negativo contengono formaldeide che è potenzialmente cancerogena.
- 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.
- I campioni fecali fissati in PVA o in MF/MIF non possono essere testati con il kit MERIFLUOR C/G. Usare solo campioni fissati in Formalina, SAF ed EcoFix®.
- Se all'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 eccessivo o da un incompleto fissaggio del campione.

NOTA: I reagenti contenuti nel kit contengono sodio azide, che è un composto potenzialmente dermo-irritante e pericoloso se ingerito. 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.

FRASI DI RISCHIO E CONSIGLI DI PRUDENZA

COLORANTE DI CONTRASTO: TOSSICO – DIMETILFORMAMIDE

FRASI DI RISCHIO:

- 61 Può essere pericoloso per i bambini non ancora nati.

CONSIGLI DI PRUDENZA:

- 45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico.
53 Evitare l'esposizione – procurarsi speciali istruzioni prima dell'uso.

REAGENTE DI IDENTIFICAZIONE: NOCIVO – SODIUM AZIDE

FRASI DI RISCHIO:

- 22 Nocivo per ingestione
32 A contatto con acidi libera gas molto tossico.

20X WASH BUFFER I: NOCIVO – SODIUM O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

FRASI DI RISCHIO:

- 33 Pericolo di effetti cumulativi.
20/21/22 Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione.

CONSIGLI DI PRUDENZA:

- 36/37 Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

CONTROLLO NEGATIVO, CONTROLLO POSITIVO: NOCIVO – FORMALDEIDE / SODIUM O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

FRASI DI RISCHIO:

- 33 Pericolo di effetti cumulativi
40 Possibilità di effetti cancerogeni, prove insufficienti.
43 Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.
20/21/22 Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione.

CONSIGLI DI PRUDENZA:

- 36/37 Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

LIQUIDO DI MONTAGGIO – NOCIVO - FORMALDEIDE

FRASI DI RISCHIO:

- 40 Possibilità di effetti cancerogeni, prove insufficienti.
43 Può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle.

CONSIGLI DI PRUDENZA:

- 36 Usare indumenti protettivi adatti.
37 Usare guanti adatti.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

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

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Lasciare che tutti i reagenti del kit raggiungano temperatura ambiente prima dell'uso.
2. Preparare il quantitativo necessario di Soluzione di lavaggio 1X. Per esempio: 2,5 mL di Soluzione 20X + 47,5 mL di acqua distillata o deionizzata. La soluzione rimasta può essere conservata a temperatura ambiente per 3 mesi.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

1. I campioni fissati in formalina al 10% in sodio acetato-acido acetico-formalina (SAF) o EcoFix® sono idonei per l'uso con questo kit. La sospensione feci-fissativo deve essere lasciata a temperatura ambiente per almeno 30 minuti al fine di assicurare una adeguata fissazione del campione. Il kit **MERIFLUOR C/G** è stato messo a punto per l'utilizzo con i campioni fissati con i prodotti della linea Para-Pak®. Raccogliere il campione seguendo le istruzioni fornite con i flaconi di fissativo.
2. Per aumentare le probabilità di evidenziazione dei microrganismi in campioni contenenti basse cariche di cisti o di oocisti, si consiglia di concentrare le feci prima di eseguire il test (vedi sezione **PRESTAZIONI SPECIFICHE**). Per ottenere risultati ottimali si consiglia di usare i sistemi Para-Pak® Macro-CON® oppure Para-Pak® CON-Trate®. La rimozione dei lipidi fecali dai campioni mucoidi può essere ottenuta mediante trattamento con etile acetato: tale processo favorisce l'adesione del materiale fecale sulla superficie dei vetrini trattati.

PROCEDURA DEL TEST

1. Usare una delle anse monouso per trasferire il sedimento fecale sul vetrino. Distribuire il materiale fecale uniformemente sull'intera superficie del pozzetto. Evitare assolutamente di graffiare la superficie trattata del vetrino.
2. Usando una seconda ansa, trasferire una goccia di Controllo Positivo in un secondo pozzetto. Distribuire il Controllo Positivo uniformemente sull'intera superficie del pozzetto. Evitare assolutamente di graffiare la superficie trattata del vetrino.
3. Usando un'ulteriore ansa, trasferire una goccia di Controllo Negativo in un secondo pozzetto.
4. Lasciar asciugare all'aria i campioni a temperatura ambiente fino a quando sono completamente asciutti (solitamente sono sufficienti 30 minuti).
5. Distribuire una goccia di Reagente di identificazione su ciascun pozzetto.
6. Distribuire una goccia di Colorante di contrasto su ciascun pozzetto.
7. Mescolare i reagenti con un bastoncino di legno e coprire l'intera superficie del pozzetto. Evitare assolutamente di graffiare la superficie trattata del vetrino.
8. Incubare i vetrini a temperatura ambiente per 30 minuti in camera umida. **Nota: Proteggere dalla luce.**

9. Usando una spruzzetta, lavare i vetrini con un getto di soluzione di lavaggio 1X non troppo violento fino a quando l'eccesso di Reagente di identificazione e di Colorante di contrasto 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.
10. Eliminare l'eccesso di tampone di lavaggio dai vetrini scuotendoli delicatamente su un tovagliolo di carta. **Nota: non lasciare asciugare i vetrini.**
11. Distribuire 1 goccia di Liquido di montaggio su ciascun vetrino e coprire con il vetrino coprioggetto.
12. Esaminare accuratamente ciascun pozzetto mediante microscopio a fluorescenza usando un ingrandimento di 100-200X. La presenza di oocisti di *Cryptosporidium* deve essere confermata usando un ingrandimento maggiore.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Controlli

1. Le oocisti di *Cryptosporidium* sono di forma rotondeggiante oppure leggermente ovale ed hanno un diametro di 2-6 µm. La parete delle oocisti appare di colore verde-mela brillante. A volte si può notare una linea di sutura.
2. Le cisti di *Giardia* sono ovali, con un diametro di 8-12 µm. La parete delle cisti appare di colore verde-mela brillante.
3. Il materiale di fondo appare colorato in rosso-arancio.
4. Il Controllo Negativo non deve evidenziare la caratteristica fluorescenza verde mela e la tipica morfologia delle cisti e oocisti.
5. Alcune colorazioni del materiale di fondo rappresentano degli artefatti. Questa fluorescenza aspecifica del materiale di fondo è facilmente discriminabile da quella specifica a causa della mancata brillantezza o dell'assenza della tipica morfologia di cisti e oocisti.

Campioni

1. **Risultato positivo per *Cryptosporidium*:** Qualsiasi campione fecale che mostri la presenza di una o più oocisti fluorescenti e caratterizzate dalla morfologia tipica, deve essere considerato positivo per *Cryptosporidium*.
2. **Risultato positivo per *Giardia*:** Qualsiasi campione fecale che mostri la presenza di una o più cisti fluorescenti e caratterizzate dalla morfologia tipica, deve essere considerato positivo per *Giardia*.
3. **Risultato negativo:** Se non si nota alcuna fluorescenza verde-mela il campione deve essere considerato negativo per la presenza di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia*. Anche i detriti del sedimento fecale che non esibiscono alcuna fluorescenza oppure la morfologia caratteristica devono essere considerati negativi.

CONTROLLO DI QUALITÀ

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

Per verificare il corretto funzionamento dei reagenti contenuti nel kit si dovrebbe includere un Controllo Positivo e un Controllo Negativo ogni volta che si esegue il test su un campione biologico. **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).**

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 perdite.

Si suggerisce di registrare i risultati dei controlli di qualità in un apposito registro per mantenere un elevato livello qualitativo del test.

VALORI ATTESI

MERIFLUOR C/G evidenzia la presenza di oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia* nei campioni fecali. Di solito i pazienti in fase acuta eliminano oocisti o cisti in quantità variabili (da moderate ad abbondanti). Alcuni individui possono continuare ad eliminare oocisti o cisti in quantità ridotte anche dopo la completa guarigione clinica.^{2,4} Si possono prevedere variazioni nella percentuale di positività del test dovute ad età, area geografica di provenienza, nonché alle condizioni generali di salute della popolazione esaminata.^{1,3}

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

MERIFLUOR C/G è un test in vitro per la diagnosi dell'infezione da *Cryptosporidium* e da *Giardia*. Sebbene la presenza di *Cryptosporidium* o di *Giardia* sia spesso associata a diarrea e vomito, è stata descritta la possibilità dell'eliminazione di oocisti o di cisti da parte di soggetti asintomatici.^{1,4} Inoltre, la presenza di oocisti o di cisti in campioni fecali non esclude la possibilità che siano presenti altri microrganismi o altre condizioni patologiche come causa della sintomatologia del paziente. Pertanto, la diagnosi finale deve essere fatta dal medico curante sulla base dell'anamnesi, del quadro clinico e del risultato di tutti gli esami di laboratorio eseguiti.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Campioni di feci fissate in formalina al 10% sono stati raccolti presso numerosi Laboratori di Riferimento e sottoposti ad esame in modo completamente anonimo. I campioni sono stati concentrati usando il sistema Para-Pak® CON-Trate® e poi colorati con i kit **MERIFLUOR C/G (DFA)**, **MERIFLUOR *Cryptosporidium* (IFA)**, e **MERIFLUOR *Giardia* (IFA)**, nonché con le colorazioni tradizionali con iodio e di acido-resistenza.

1. *Cryptosporidium*

La Tabella seguente paragona i risultati delle varie tecniche di colorazione per la ricerca delle oocisti di *Cryptosporidium* su 115 campioni di feci. Per i campioni contenenti elevate cariche di oocisti i risultati positivi sono stati ottenuti mediante le tre principali metodiche di colorazione. Per i 15 campioni che presentavano risultati discrepanti, sono state osservate basse cariche di oocisti mediante le colorazioni tradizionali. Per risolvere i dubbi, questi campioni sono stati testati altre due volte con tutti i metodi.

DFA	Colorazione di acido-resistenza		Risultati risolti		DFA	Immunofluorescenza indiretta		Risultati risolti	
	+	-	+	-		+	-	+	-
+	24	13	32	5	+	36	1	37	0
-	2	76	1	77	-	0	78	0	78

Sensibilità	92%	97%	Sensibilità	100%	100%
Specificità	85%	94%	Specificità	99%	100%
Concordanza	87%	95%	Concordanza	99%	100%

2. Giardia

La Tabella seguente paragona i risultati delle varie tecniche di colorazione per la ricerca delle cisti di *Giardia* in 115 campioni di feci. Per i sei campioni che presentavano risultati discrepanti, sono state osservate basse cariche di oocisti mediante le colorazioni tradizionali. Per risolvere i dubbi, questi campioni sono stati colorati con la colorazione tricromica usando i corrispondenti campioni fissati in PVA.

DFA	Colorazione con iodo		Risultati risolti		DFA	Immunofluorescenza indiretta		Risultati risolti	
	+	-	+	-		+	-	+	-
+	38	4	42	0	+	42	0	42	0
-	2	71	0	73	-	0	73	0	73

Sensibilità	95%	100%	Sensibilità	100%	100%
Specificità	95%	100%	Specificità	100%	100%
Concordanza	95%	100%	Concordanza	100%	100%

3. Feci non concentrate

I campioni sono stati testati mediante il kit **MERIFLUOR C/G** prelevando il materiale direttamente dai flaconi di formalina o dopo la concentrazione. Due dei 32 campioni positivi per *Cryptosporidium* dopo concentrazione risultavano negativi al test sul materiale fecale non concentrato. In entrambi i casi la carica di oocisti osservata, dopo concentrazione, era bassa. Si è ottenuta una completa concordanza, invece, per i 40 campioni contenenti *Giardia*.

CROSS-REATTIVITÀ

I seguenti microrganismi non hanno mostrato reazioni positive quando testati con il kit **MERIFLUOR C/G**:

Blastocystis hominis, *Candida albicans*, *Chilomastix mesnili*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*

FRANÇAIS

MERIFLUOR®

CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA

Méthode de détection simultanée des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* dans les selles par immunofluorescence directe

REF 250050

VD Dispositif médical de diagnostic in vitro

BUT DE LA METHODE

MERIFLUOR *Cryptosporidium*/Giardia (MERIFLUOR C/G) est une méthode in vitro de détection simultanée des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* dans les selles par immunofluorescence directe.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Cryptosporidium:

Les protozoaires du genre *Cryptosporidium* sont rencontrés dans le monde entier et provoquent une gastro-entérite limitée chez les individus immunocompétents. Les symptômes primaires comprennent une diarrhée violente, aqueuse accompagnée par des vomissements, des crampes abdominales et une fièvre légère durant 2 à 14 jours.^{1,2} Chez les patients immunodéprimés, les symptômes sont plus graves et plus persistants et ils peuvent provoquer le décès, en particulier chez les patients souffrant de Syndrome d'Immunodéficience Acquise.^{1,2} Les tentatives pour trouver des traitements médicamenteux efficaces ont été infructueuses jusqu'à présent.

Cryptosporidium spp. ont été retrouvés chez de nombreux animaux domestiques comme la volaille, les veaux, les moutons et les chèvres. Le premier isolement de *Cryptosporidium* chez l'homme a été signalé en 1976. Bien que de nombreuses espèces aient été décrites, peu de spécificités de hôte ont été retrouvées.^{1,2} Le micro-organisme est petit (2-6 µm), de forme de coocyste. Le parasite effectue son cycle de reproduction dans les microvillosités de la paroi intestinale, bien que sa présence dans d'autres sites ait été signalée.^{1,2} Les oocystes infectants sont excrétés dans les fèces de l'hôte. La contamination oro-fécale est le mode de transmission le plus vraisemblable.^{1,2}

Le diagnostic précoce de la cryptococcose sur du matériel fécal évite les techniques d'exploration invasives et facilite les mesures de suivi. Bien que de nombreuses méthodes de détection des oocystes dans les fèces aient été décrites, la coloration acido-résistance (Ziehl-Neelsen modifiée) est la méthode la plus couramment utilisée.¹ La nature acido-résistante de l'oocyste le rend difficile à différencier des autres organismes non cryptosporidiens acido-résistants et de taille comparable.

Giardia:

La giardiose est une des infections parasitaires intestinales les plus répandues dans le monde.³ La nourriture contaminée, les eaux de surface non traitées polluées avec des fèces animales contenant des kystes, avec une filtration insuffisante de l'eau sont les sources principales.^{3,4} De plus, les services de santé publique considèrent la giardiose comme une maladie sexuellement transmissible.³

Les micro-organismes du genre *Giardia* ont été observés pour la première fois en 1675 par Antony Van Leeuwenhoek.³ *Giardia* sp. est un protozoaire flagellé existant sous deux formes: 1) un trophozoïte mobile et se nourrissant activement (9-21 µm de long et 5-15 µm de large) retrouvé à la surface de l'intestin grêle; 2) un kyste infectueux de forme ovale qui est plus petit (8-12 µm de long et 7-10 µm de large) et qui contient 2 à 4 noyaux.^{3,4}

Les manifestations cliniques d'une infection par *Giardia* varient d'un passage de kyste avec une atteinte gastro-intestinale légère à des cas aigus comprenant une diarrhée violente, aqueuse et d'odeur nauséabonde, des crampes abdominales ainsi que des ballonnements, des flatulences, de l'anorexie et des nausées.^{3,4} Bien que quelques cas soient de durée limitée, les symptômes d'une infection aiguë ou subaiguë peuvent persister de plusieurs jours à plusieurs mois.^{3,4} Un traitement médicamenteux à base d'hydrochlorure de quinacrine, de metronidazole et de furazolidone a été recommandé pour les porteurs transitoires de kystes ainsi que pour les patients symptomatiques.^{3,4}

Le diagnostic clinique de la giardiose est effectué en routine par examen microscopique direct des selles ou des selles concentrées à la recherche de kystes et/ou de trophozoïtes. Les méthodes de coloration conventionnelles donnent un taux de sensibilité de 50-70%. Des taux plus faibles ont été observés quand les kystes étaient présents à de faibles concentrations.^{4,5} Des examens de liquide d'aspiration duodénal ou jéjunal et de petits échantillons de biopsie intestinale ont été utilisés pour améliorer les taux de sensibilité conventionnels mais ils sont traumatisants et coûteux. D'autres méthodes comprennent le sérodiagnostic par immunofluorescence ou par dosage immunoenzymatique, cependant aucune technique ne permet d'identifier une infection active à *Giardia*.^{4,5}

L'association entre les infections à *Cryptosporidium* et à *Giardia* n'a pas été démontrée. Cependant, de nombreux cas de co-infections par les deux micro-organismes ont été décrits.⁶

La méthode de détection par immunofluorescence directe **MERIFLUOR C/G** détecte rapidement et de manière fiable les oocystes de *Cryptosporidium* et les kystes de *Giardia* dans les échantillons cliniques. La spécificité des anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium* et anti-*Giardia* est associée à la sensibilité du dosage par immunofluorescence directe. La technique d'immunofluorescence est simple à effectuer et a une sensibilité supérieure à celles des méthodes de coloration classiques.^{7,8}

PRINCIPE DU TEST

MERIFLUOR C/G utilise le principe de l'immunofluorescence directe. Le réactif de détection contient un mélange d'anticorps monoclonaux marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et dirigés contre les antigènes de la paroi cellulaire des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia*. Un échantillon fécal préparé est traité par le réactif de détection et un contre-colorant. Les anticorps monoclonaux se fixent sur les antigènes de *Cryptosporidium* et de *Giardia* présents dans l'échantillon. Les lames sont rincées pour éliminer les anticorps non fixés, puis on ajoute du milieu de montage et une lamelle avant d'observer les lames avec un microscope à fluorescence, à la recherche de la coloration et de la morphologie caractéristique des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia*. Les autres éléments de la préparation sont colorés d'orange mat 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.

- Réactif de détection:** Anticorps monoclonaux anti-*Cryptosporidium* et anti-*Giardia* marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), dans une solution tampon contenant un stabilisant protéique et 0,1% d'azide de sodium.
- Contre-colorant:** Solution de noir ériochrome.
- Tampon de lavage 20X:** Tampon de lavage concentré avec conservateur.
- Contrôle positif*:** Préparation de selles contenant des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* tués et stabilisés au formol contenant 0,09% de thimérol.
- Contrôle négatif*:** Selles stabilisées au formol contenant 0,09% de thimérol.
- Milieu de montage:** Solution tamponnée de glycérol contenant du formol, un anti-bloquant et 0,05% d'azide de sodium.
- Anses de transfert**
- Lames traitées**

*REMARQUE: Ces réactifs contiennent du formaldéhyde, composant suspecté cancérigène.

MATERIEL NON FOURNI

- Eau distillée ou désionisée.
- Flacon de lavage.
- Chambre humide.
- Lamelles couvre-lames de microscope (22 x 50 mm), épaisseur n°1.

5. Microscope de fluorescence équipé d'un système de filtre pour l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et avec les paramètres suivants: longueur d'onde d'excitation: 490-500 nm, Filtre de barrière: 510-530 nm.
6. Bâtonnets applicateurs.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs et les composants sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Ne pas mélanger les réactifs de coffrets de lots différents.
3. Ne pas utiliser de composants du coffret ayant dépassé la date de péremption.
4. Conserver le réactif de détection et le contre-colorant à l'abri de la lumière.
5. Tous les réactifs doivent être agités soigneusement avant usage.
6. Remplacer les bouchons sur les flacons correspondants.
7. Faire attention de ne pas rayer la surface traitée avec l'anse ou le bâtonnet d'application lors du dépôt des échantillons ou des réactifs sur la lame.
8. Le milieu de montage, le contrôle positif et le contrôle négatif contiennent du formol. Eviter tout contact avec la peau et les vêtements. Rincer soigneusement la zone concernée en cas de contact.
9. Le contrôle positif contient des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia* tués par le formol. Il devra cependant être manipulé comme un échantillon potentiellement infectieux.
10. Les contrôles positifs et négatifs contiennent de la formaldéhyde, composant suspecté cancérigène.
11. Les échantillons des patients peuvent contenir du VIH ou d'autres agents infectieux et ils devront être manipulés par du personnel correctement entraîné et éliminés comme le matériel contaminé. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons des patients et pendant la réalisation du test.
12. Les échantillons conservés en PVA ou MF/MIF ne sont pas utilisables avec **MERIFLUOR C/G**. Les échantillons conservés dans du formol, du SAF, ou de l'EcoFix®, peuvent être utilisés.
13. Si aucun débris fécal n'est observé lors de l'examen de la lame, une perte d'échantillon a eu lieu. Ceci est habituellement dû à un lavage trop énergique ou à un temps de séchage de l'échantillon insuffisant.

ATTENTION: Les réactifs de ce coffret contiennent de l'azide de sodium. L'élimination de réactifs contenant de l'azide de sodium dans des canalisations en plomb ou en cuivre peut provoquer la formation d'azides métalliques explosifs. Ceci peut être évité en rinçant avec un volume d'eau important lors de telles éliminations.

PHRASES DE RISQUES ET CONSEILS DE PRUDENCE CONTRE-COLORANT : TOXIQUE - DIMETHYLFORMAMIDE

PHRASES DE RISQUES :

- 61 Peut être nocif pour le fœtus.

CONSEILS DE PRUDENCE :

- 45 En cas d'incident ou de malaise, demander immédiatement l'avis d'un médecin (lui montrer l'étiquette si possible).
- 53 Eviter de s'exposer au produit - demander les instructions spéciales avant utilisation.

ANTICORPS DE DETECTION: NOCIF – AZIDE DE SODIUM

PHRASES DE RISQUES:

- 22 Nocif en cas d'ingestion.
- 32 Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.

TAMPON DE LAVAGE 20X: NOCIF –O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE DE SODIUM (THIMEROSAL)

PHRASES DE RISQUES:

- 33 Danger d'effets cumulatifs.
- 20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion

CONSEILS DE PRUDENCE:

- 36/37 Porter des gants et des vêtements de protection adaptés.

CONTROLE NEGATIF, CONTROLE POSITIF: NOCIF – FORMALDEHYDE / O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE DE SODIUM (THIMEROSAL)

PHRASES DE RISQUES :

- 33 Danger d'effets cumulatifs
- 40 Risques possibles d'effets irréversibles.
- 43 Peut causer une sensibilisation par contact cutané.
- 20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion.

CONSEILS DE SECURITE :

- 36/37 Porter des gants et des vêtements de protection adaptés.

MILIEU DE MONTAGE – NOCIF – FORMALDEHYDE

PHRASES DE RISQUES :

- 40 Risques possibles d'effets irréversibles.
- 43 Peut causer une sensibilisation par contact cutané.

CONSEILS DE PRUDENCE:

- 36 Porter un vêtement de protection approprié.
- 37 Porter des gants appropriés.

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration du coffret **MERIFLUOR C/G** est indiquée sur l'étiquette de la boîte. Afin de garder les meilleures performances, conserver le coffret à 2-8 C et le replacer rapidement au réfrigérateur après chaque utilisation. **ATTENTION : NE PAS CONGELER.**

PREPARATION DES REACTIFS

1. Ramener tout le coffret à température ambiante avant utilisation.

2. Préparer du tampon de lavage dilué (1X) selon les besoins. Par exemple : 2,5 mL de tampon de lavage concentré 20X + 47,5 mL d'eau distillée ou désionisée. Le tampon de lavage 1X peut être stocké trois mois à température ambiante.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

1. Les échantillons de selles conservés dans du formol à 10%, dans le mélange formol-acide acétique-acétate de sodium (SAF), ou dans le conservateur EcoFix®, peuvent être utilisés. Le mélange selles/conservateur doit être laissé au moins 30 minutes à température ambiante pour obtenir une fixation correcte. Le coffret **MERIFLUOR C/G** est conçu pour être utilisé avec la gamme de produits pour parasitologie Para-Pak®. Récolter l'échantillon comme indiqué sur la notice technique fournie avec le kit Para-Pak® approprié. Les notices techniques des flacons Para-Pak® formol et Para-Pak® SAF peuvent être fournies par Meridian Bioscience.
2. Pour augmenter la probabilité de détection dans des selles contenant un nombre peu élevé de kystes ou d'oocystes, l'échantillon peut être concentré avant d'être traité (cf. "**PERFORMANCES DU TEST**"). Les systèmes Para-Pak® Macro-CON® et Para-Pak® CON-Trate® sont recommandés pour cet usage. L'élimination des lipides fécaux par de l'acétate d'éthyle peut être particulièrement bénéfique si l'échantillon fécal est muqueux. La délipidation peut faciliter l'adhérence du matériel fécal à la lame traitée.

PROCEDURE DE TEST

1. Utiliser une anse de transfert pour transférer 1 goutte de matériel fécal sur la lame traitée. Répartir l'échantillon sur toute la surface du puits. Ne pas rayer la surface traitée de la lame.
2. Utiliser une nouvelle anse de transfert pour transférer 1 goutte de contrôle positif dans un autre puits de la lame traitée. Répartir le contrôle sur toute la surface du puits. Ne pas rayer la surface traitée de la lame.
3. Utiliser une nouvelle anse de transfert pour transférer 1 goutte de contrôle négatif dans un autre puits de la lame traitée.
4. Laisser la lame sécher complètement à l'air à température ambiante (ceci prend habituellement 30 minutes).
5. Mettre 1 goutte de réactif de détection dans chacun des puits.
6. Mettre 1 goutte de contre-colorant dans chacun des puits.
7. Mélanger les réactifs avec un bâtonnet applicateur et les répartir sur toute la surface du puits. Ne pas rayer la surface traitée de la lame.
8. Laisser incuber la lame en chambre humide pendant 30 minutes à température ambiante. **Remarque:** l'incubation doit se faire à l'abri de la lumière.
9. A l'aide d'un flacon de lavage, rincer doucement la lame avec du tampon de lavage 1X jusqu'à élimination complète du réactif de détection et du contre-colorant en excès. **Remarque: ne pas inonder les lames pendant le rinçage.** Eviter tout mouvement de l'échantillon ou toute contamination croisée entre les échantillons.
10. Eliminer le tampon de lavage en excès en tapant le côté long de la lame sur du papier absorbant propre. **Remarque: ne pas laisser sécher la lame.**
11. Ajouter 1 goutte de milieu de montage dans chaque puits et recouvrir d'une lamelle.
12. Examiner soigneusement chaque puits avec un grossissement 100-200X. la présence des oocystes de *Cryptosporidium* devra être confirmée par un grossissement supérieur.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Réactions de contrôle

1. Les oocystes de *Cryptosporidium* sont de forme ronde à légèrement ovale, de 2-6 µm de diamètre. La paroi de l'oocyste est colorée en vert pomme brillant. Une ligne de suture peut également être vue.
2. Les kystes de *Giardia* sont des micro-organismes de forme ovale, de 8-12 µm de long. La paroi du kyste est colorée en vert pomme brillant.
3. Les autres éléments de la préparation sont colorés d'orange mat à rouge par le contre-colorant.
4. Aucune fluorescence vert pomme caractéristique de la morphologie d'un kyste ou oocyste ne doit apparaître sur le puits de contrôle négatif.
5. Un artefact peut éventuellement colorer la préparation. Cette fluorescence est aisément discernable de la couleur vert pomme brillant ou de la morphologie caractéristique du kyste.

Réactions de test

1. **Test *Cryptosporidium* positif:** tout échantillon de selles montrant un ou plusieurs oocystes avec une coloration vert pomme et la morphologie caractéristique, devra être considéré positif pour la présence de *Cryptosporidium* sp.
2. **Test *Giardia* positif:** tout échantillon de selles montrant un ou plusieurs kystes avec une coloration vert pomme et la morphologie caractéristique, devra être considéré positif pour la présence de *Giardia*.
3. **Test négatif:** tout échantillon de selles sans fluorescence vert pomme devra être considéré comme négatif pour la présence de *Cryptosporidium* et de *Giardia*. La fluorescence des éléments de fond ne montrant pas de couleur vert pomme brillant ou la morphologie caractéristique devra également être considérée comme négative.

CONTROLE DE QUALITE

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

Afin d'effectuer le contrôle de qualité des réactifs contenus dans le coffret, les contrôles positif et négatif devront être testés chaque fois que des échantillons de patient sont testés. **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 contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.**

Lors de chaque utilisation, les composants du coffret doivent être examinés visuellement à la recherche de signes visibles de contamination, de congélation ou de fuites.

Il est recommandé de consigner les résultats de chaque contrôle de qualité dans un cahier de laboratoire afin de maintenir une qualité élevée de procédures de test.

VALEURS ATTENDUES

Le test **MERIFLUOR C/G** en immunofluorescence directe permet d'identifier la présence d'ocystes de *Cryptosporidium* et de kystes de *Giardia* dans des échantillons de selles. Les patients en phase active de l'une des maladies éliminent respectivement des ocystes ou des kystes en nombre modéré à important. Quelques patients continuent à excréter des ocystes ou des kystes en faible quantité après la guérison clinique complète.^{2,4} Des variations dans le taux de positivité sont à prévoir en fonction de l'âge, de la localisation géographique et des conditions sanitaires générales de la population de patients étudiée.^{1,3}

LIMITES DU TEST

MERIFLUOR C/G est une méthode diagnostique in vitro destinée à fournir une aide au diagnostic des infections à *Cryptosporidium* et à *Giardia*. Alors que la présence de *Cryptosporidium* ou de *Giardia* est souvent associée à des diarrhées et à des vomissements, la dispersion d'ocystes ou de kystes par des individus asymptomatiques a été observée.^{1,4} De plus, la présence d'ocystes ou de kystes dans un échantillon de selles n'exclut pas la présence d'autres micro-organismes ou d'une autre atteinte sous-jacente provoquant les symptômes du patient. Pour cette raison, d'autres tests appropriés devront être effectués à la recherche d'autres agents étiologiques.

PERFORMANCES DU TEST

Des échantillons de selles conservés dans du formol à 10% ont été obtenus de plusieurs laboratoires de référence et ont été testés dans une étude en aveugle. Les échantillons ont été concentrés avec le système Para-Pak® CON-Trate® et marqués avec **MERIFLUOR C/G** (IFD), **MERIFLUOR Cryptosporidium** (IFI) et **MERIFLUOR Giardia** (IFI), avec la méthode acido-résistance (Ziehl-Neelsen modifiée) et avec de l'iode.

1. *Cryptosporidium*

Les tableaux suivants comparent les résultats des diverses procédures de coloration des ocystes de *Cryptosporidium* dans 115 selles. Dans les échantillons contenant de nombreux ocystes, des résultats positifs ont été obtenus par les trois méthodes concernées. Dans les 15 échantillons donnant des résultats discordants, un nombre faible d'ocystes a été observé par la méthode de marquage positif. Afin de résoudre les résultats discordants, ces échantillons ont été colorés deux fois par chaque méthode.

	Acido-résistance		Résolus			IFI		Résolus	
	+	-	+	-		+	-	+	-
DFA +	24	13	32	5	DFA +	36	1	37	0
DFA -	2	76	1	77	DFA -	0	78	0	78
Sensibilité	92%		97%		Sensibilité	100%		100%	
Spécificité	85%		94%		Spécificité	99%		100%	
Corrélation	87%		95%		Corrélation	99%		100%	

2. *Giardia*

Les tableaux suivants comparent les résultats des diverses procédures de coloration des kystes de *Giardia* dans 115 échantillons de selles concentrées. Dans six échantillons donnant des résultats discordants, un nombre faible d'ocystes a été observé par la méthode de marquage positif. Afin de résoudre les résultats discordants, ces échantillons ont été colorés deux fois par chaque méthode.

	Iode		Résolus			IFI		Résolus	
	+	-	+	-		+	-	+	-
DFA +	38	4	42	0	DFA +	42	0	42	0
DFA -	2	71	0	73	DFA -	0	73	0	73
Sensibilité	95%		100%		Sensibilité	100%		100%	
Spécificité	95%		100%		Spécificité	100%		100%	
Corrélation	95%		100%		Corrélation	100%		100%	

3. Selles non concentrées

Les échantillons ont été colorés avec **MERIFLUOR C/G** directement à partir du flacon de formol ou après concentration. Deux des 32 échantillons positifs pour *Cryptosporidium* dans les selles concentrées étaient négatifs dans l'échantillon non concentré. Dans ces deux cas, on a observé peu d'ocystes dans l'échantillon concentré. Il y a eu une corrélation parfaite pour *Giardia* avec 40 échantillons positifs.

REACTIONS CROISEES

Les micro-organismes suivants n'ont donné aucune fluorescence avec **MERIFLUOR C/G**.⁸

Blastocystis hominis, *Candida albicans*, *Chilomastix mesnili*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmani*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*

ESPAÑOL

MERIFLUOR®

CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA

Procedimiento de detección por inmunofluorescencia directa para la detección simultánea de ocitos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en la materia fecal

REF 250050

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

USO INDICADO

MERIFLUOR Cryptosporidium/Giardia (MERIFLUOR C/G) es un procedimiento de detección in vitro por inmunofluorescencia directa para la detección simultánea de ocitos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en la materia fecal.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Cryptosporidium:

Los protozoos del género *Cryptosporidium* se encuentran por todo el mundo y producen una gastroenteritis autolimitada en individuos inmunocompetentes. Los principales síntomas incluyen diarrea acuosa y explosiva acompañada de vómitos, calambres abdominales y fiebre baja que dura de dos a catorce días.^{1,2} En pacientes inmunodeprimidos los síntomas son más severos y persistentes y pueden producir mortalidad especialmente en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.^{1,2} Los intentos en encontrar agentes quimioterapéuticos efectivos no han tenido éxito hasta este momento.

Cryptosporidium spp. se ha encontrado en una variedad de animales domésticos así como en aves de corral, terneros, corderos y cabras. El primer aislamiento de *Cryptosporidium* desde un humano fue reportado en 1976. Aunque se han descrito varias especies, se ha señalado una baja especificidad de huésped.^{1,2} El organismo es un pequeño cocidio de 2-6 micras. El parásito lleva a cabo su ciclo vital en los bordes de microvilli del intestino, aunque ha sido reportada su aparición en otros lugares.^{1,2} Los ocitos/infecciosos son excretados dentro de las heces del huésped. La contaminación fecal-oral es la vía más probable de transmisión.^{1,2}

El diagnóstico temprano de cryptosporidiosis utilizando materia fecal puede eliminar la necesidad de procedimientos invasivos y facilitar medidas de apoyo. Aunque se han descrito varios métodos para la detección de ocitos en heces, la tinción ácido-rápida modificada es el proceso realizado de manera más común.¹ La naturaleza ácido-rápida de los ocitos los hace difícil de ser diferenciados de otros organismos ácido-rápidos no cryptosporidiales de tamaño comparable.

Giardia:

La giardiasis es una de las infecciones parasitarias intestinales más comunes del mundo.³ Las fuentes principales son la comida contaminada y el agua superficial no tratada que ha sido contaminada con heces de animales que contienen quistes. Todo esto en conjunción con una filtración inadecuada en las instalaciones de tratamiento del agua.^{3,4} Además, las autoridades en salud pública incluyen la giardiasis en las enfermedades de transmisión sexual.³

Los organismos del género *Giardia* fueron observados por primera vez en 1675 por Antony van Leeuwenhoek.³ *Giardia* sp. son protozoos flagelados que existen en dos formas: 1) un trofozoito móvil y que se alimenta activamente (9-21 µm. de largo y 5-15 µm. de ancho), ubicado en la superficie del intestino delgado; 2) un quiste infeccioso de forma ovalada que es más pequeño (8-12 µm. de largo y 7-10 µm. de ancho) y que contiene de dos a cuatro núcleos.^{3,4}

Las manifestaciones clínicas de una infección por *Giardia* van desde el portador asintomático de quistes con solamente leves molestias gastrointestinales hasta casos severamente agudos que comportan diarrea acuosa, explosiva y hedionda con calambres abdominales así como con abotagamiento, flatulencia, anorexia y náuseas.^{3,4} Aunque algunos casos presentan un estado auto-limitante, los síntomas de una infección aguda o subaguda pueden persistir desde varios días hasta varios meses.^{3,4} El tratamiento con drogas terapéuticas utilizando cloruro de quinacrina, metronidazol y furazolidona ha sido recomendado para portadores asintomáticos de quistes así como para pacientes con síntomas.^{3,4}

El diagnóstico clínico de la giardiasis se realiza rutinariamente por examen microscópico directo de las heces o del concentrado de heces buscando la presencia de quistes y/o trofozoitos. Los métodos de tinción convencionales proporcionan un ratio de sensibilidad del 50-70% se han dado ratios más bajos cuando los quistes se presentan a niveles bajos.^{4,5} El examen de las muestras de aspirados de fluido jejunal y duodenal y de biopsias del intestino delgado se han utilizado para mejorar los ratios de sensibilidad convencionales pero son invasivos y costosos. Otros métodos incluyen el serodiagnóstico por inmunofluorescencia y el enzimoimmunoensayo, no obstante, ninguna técnica indica una infección activa por *Giardia*.^{4,5}

No ha sido demostrada una asociación entre la infección por *Cryptosporidium* y *Giardia*. No obstante se han documentado numerosos casos de coinfección por ambos organismos.⁶

El procedimiento de detección por inmunofluorescencia directa **MERIFLUOR C/G**, detecta rápida y precisamente los oocitos de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia* en muestras clínicas. La especificidad de los anticuerpos monoclonales por *Cryptosporidium* y *Giardia* se combina con la sensibilidad del ensayo de la inmunofluorescencia directa. La técnica de la inmunofluorescencia es de fácil realización y se ha demostrado que posee una sensibilidad más alta que los procedimientos de tinción tradicionales.^{7,8}

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

MERIFLUOR C/G utiliza el principio de la inmunofluorescencia directa. El Reactivo de Detección contiene una mezcla de anticuerpos monoclonales unidos a FITC y dirigidos contra los antígenos de la pared celular de los oocitos de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia*. Una muestra fecal preparada se trata con el Reactivo de Detección y la Tinción de Contraste. Los anticuerpos monoclonales se unen a los antígenos de *Cryptosporidium* y *Giardia* presentes en la muestra. Se lavan los portas para retirar los anticuerpos no unidos, se fija un cubreobjetos con Medio de Montaje y los portas se examinan utilizando un microscopio de fluorescencia en busca del color verde manzana y la morfología característica de los oocitos de *Cryptosporidium* y los quistes de *Giardia*. El material de fondo de la muestra se contrañe de naranja suave hasta rojo.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

1. **Reactivo de Detección:** Anticuerpos monoclonales anti-*Cryptosporidium* y anti-*Giardia* unidos a FITC en una solución tamponada que contiene un estabilizante proteico y 0,1% de azida sódica.
2. **Tinción de Contraste:** Solución de Negro de Eriocromo.
3. **Tampón de Lavado 20X:** Tampón de lavado concentrado con un conservante.
4. **Control Positivo*:** Preparación de heces en formalina con oocitos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* contiene 0,09% de timerosal.
5. **Control Negativo*:** Heces en formalina contiene 0,09% de timerosal.
6. **Medio de Montaje:** Glicerol tamponado que contiene formalina y 0,05% de azida sódica.
7. **Asas de Transferencia**
8. **Portas Tratados**

*NOTA: Estos reactivos contienen formaldehído que es un cancerígeno potencial.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Botella para el lavado.
3. Cámara húmeda.
4. Cubreobjetos de 22x50 mm., grosor #1
5. Microscopio de fluorescencia equipado con un sistema de filtro para fluoresceína isotiocianato (FITC) y con los siguientes parámetros: Longitud de onda de excitación: 490-500 nm, Filtro de barrera: 510-530 nm.
6. Aplicadores de madera.

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos y componentes son solo para uso diagnóstico in vitro.
2. No mezcle reactivos de kits con diferente número de lote.
3. No utilice los componentes del kit más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
4. Proteja el Reactivo de Detección y la Tinción de Contraste de la exposición a la luz.
5. Todos los reactivos deberían ser agitados suavemente antes de ser utilizados.
6. Coloque de nuevo los tapones en sus viales correspondientes.
7. Cuando distribuya las muestras o los reactivos por los pocillos del porta, tenga cuidado en no rasgar la superficie tratada con el asa o con el aplicador de madera.
8. El Medio de Montaje, el Control Positivo y el Control Negativo contienen formaldehído que es un irritante. Evite el contacto con la piel o con la ropa. Si se sucediera el contacto, lave el área a fondo con agua abundante.
9. El Control Positivo contiene oocitos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* muertos en formalina, no obstante, debería ser manipulada como una muestra potencialmente infecciosa.
10. Los controles positivo y negativo contienen formaldehído que es un cancerígeno potencial.
11. Las muestras de pacientes pueden contener VIH u otros agentes infecciosos y deberían ser manipuladas por personal entrenado adecuadamente y desechadas como material biopeligroso potencial. Use guantes desechables mientras manipule las muestras de pacientes y mientras realice el procedimiento del test.
12. Las muestras conservadas en PVA o MF/MIF no son adecuadas para ser utilizadas con **MERIFLUOR C/G**. Pueden ser utilizadas las muestras conservadas en SAF, EcoFix® y Formalina.
13. Si el material fecal no es visto una vez examinados los pocillos del porta, puede haber acontecido una pérdida de la muestra. Esto es habitualmente debido a un procedimiento de lavado muy vigoroso a un tiempo insuficiente de secado de la muestra.

ADVERTENCIA: Algunos reactivos de este kit contienen azida sódica que es un irritante de la piel. Evite el contacto de los reactivos con la piel. El desecho de reactivos que contienen azida sódica dentro de cañerías de plomo o cobre puede provocar la formación de azidas metálicas explosivas. Esto se puede evitar haciendo correr un gran volumen de agua durante el desecho.

FRASES DE RIESGO Y SEGURIDAD

TINCIÓN DE CONTRASTE: TÓXICO—DIMETILFORMAMIDA

FRASES DE RIESGO:

- 61 Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto.

FRASES DE SEGURIDAD:

- 45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).
53 Evítese la exposición – recábense instrucciones especiales antes del uso.

REACTIVO DE DETECCIÓN: NOCIVO – SODIUM AZIDE

FRASES DE RIESGO:

- 22 Nocivo por ingestión.
32 En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

TAMPÓN DE LAVADO 20X: NOCIVO – SODIUM O-ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

FRASES DE RIESGO:

- 33 Peligro de efectos acumulativos.
20/21/22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

FRASES DE SEGURIDAD:

- 36/37 Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

CONTROL NEGATIVO, CONTROL POSITIVO: NOCIVO—FORMALDEHIDO - SODIUM O-ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

FRASES DE RIESGO:

- 33 Peligro de efectos acumulativos.
40 Posibles efectos cancerígenos.
43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.
20/21/22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

FRASES DE SEGURIDAD:

- 36/37 Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados

MEDIO DE MONTAJE - NOCIVO—FORMALDEHIDO

FRASES DE RIESGO:

- 40 Posibles efectos cancerígenos.
43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

FRASES DE SEGURIDAD:

- 36 Úsense indumentaria protectora adecuada.
37 Úsense guantes adecuados.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad del kit **MERIFLUOR C/G** está indicada en la etiqueta del mismo. Para mantener un rendimiento óptimo, el kit debería almacenarse a 2-8 C y ser colocado de nuevo y con prontitud al refrigerador después de cada utilización. **PRECAUCIÓN: NO CONGELAR.**

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

1. Permita que todo el kit alcance la temperatura ambiente antes de ser utilizado.
2. Prepare la cantidad de tampón de lavado 1X que necesite. Por ejemplo: 2,5 mL de tampón de lavado 20X + 47,5 mL de agua destilada o desionizada. El tampón de lavado 1X no utilizado puede ser almacenado a temperatura ambiente hasta tres meses.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Deberían ser utilizadas las muestras de heces conservadas en formalina 10% o en sodio acetato-acético formalina-ácido (SAF). La mezcla conservante-heces debe dejarse permanecer un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente para asegurar una adecuada fijación. **MERIFLUOR C/G** está diseñado para ser utilizado con los productos de la línea de parasitología Para-Pak®. Recoja la muestra tal como se indica en el protocolo del Para-Pak® adecuado que se suministra con el sistema de recogida. Protocolos complementarios de Para-Pak® Formalina o SAF pueden ser suministrados por el Centro de Asistencia Técnica de Meridian Bioscience Inc. Por favor llame al 1-513-271-3700.
2. Para aumentar la probabilidad de detección en heces con baja cantidad de quistes u oocitos, la muestra puede ser concentrada antes de ser procesada (ver **CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO**). Los Sistemas Para-Pak® Macro-CON® y Para-Pak® CON-Trate® se recomiendan para este propósito. La retirada de lípidos fecales a través de acetato de etilo puede ser particularmente beneficiosa si la muestra fecal es mucóide. La deslipidización facilitará la adherencia de la materia fecal al porta tratado.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Utilice una asa de transferencia para transferir una gota de materia fecal al pocillo del porta tratado. Extienda la muestra por todo el pocillo. No rasque la superficie tratada del porta.
2. Utilice una nueva asa de transferencia para transferir una gota de Control Positivo a otro pocillo del porta tratado. Extienda el Control Positivo por todo el pocillo. No rasque la superficie tratada del porta.
3. Utilice una nueva asa de transferencia para transferir una gota de Control Negativo a otro pocillo del porta tratado.
4. Deje que los portas se sequen completamente a temperatura ambiente (habitualmente se requieren 30 minutos).
5. Deposite una gota de Reactivo de Detección en cada pocillo.
6. Deposite una gota de Tinción de Contraste en cada pocillo.
7. Mezcle los reactivos con un aplicador de madera y extiéndalos por todo el pocillo. No rasque la superficie tratada del porta.
8. Incube los portas en una cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente. **Nota: Protéjalos de la luz.**
9. Utilice una botella de lavado para lavar los portas con un suave chorro de Tampón de Lavado 1X hasta que sea retirado el exceso de Reactivo de Detección y Tinción de Contraste. **Nota: No sumerja los portas durante el lavado.** Evite alterar la muestra o provocar la contaminación cruzada de las muestras.
10. Retire el exceso de tampón golpeando el borde largo del porta contra una toalla de papel limpia. **Nota: No deje que el porta se seque.**
11. Añada una gota de Medio de Montaje a cada pocillo y aplique un cubreobjetos.

12. Examine a conciencia cada pocillo utilizando un aumento de 100-200X. La presencia de oocitos de *Cryptosporidium* debería ser confirmada a un aumento mayor.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Reacciones del Control:

- Los oocitos de *Cryptosporidium* son de forma redonda hasta ligeramente ovalada y tienen 2-6 mm de diámetro. La pared del oocitose teñirá de verde manzana brillante. Puede también ser visible una línea de sutura.
- Los quistes de *Giardia* son organismos de forma ovalada y de 8-12 mm de largo. La pared del quiste se teñirá de verde manzana brillante.
- El material de fondo debería teñirse de naranja suave hasta rojo.
- El pocillo del control negativo no debería exhibir fluorescencia verde manzana de una morfología característica de quiste u oocito.
- Alguna coloración de fondo puede a veces resultar un artefacto de la preparación del porta. Esta fluorescencia de fondo es fácilmente discernible por la ausencia de un vibrante color verde manzana o por la morfología característica del quiste.

Muestras de Pacientes:

- Resultado positivo para *Cryptosporidium*:** Cualquier muestra fecal que muestre uno o más oocitos de color verde manzana y morfología característica debería ser considerado positivo en cuanto a la presencia de *Cryptosporidium* sp.
- Resultado positivo para *Giardia*:** Cualquier muestra fecal que muestre uno o más quistes de color verde manzana y morfología característica debería ser considerado positivo en cuanto a la presencia de *Giardia*.
- Resultado Negativo:** Una muestra fecal sin fluorescencia verde manzana debería ser considerada negativa en cuanto a la presencia de oocitos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia*. El material de fondo fluorescente de restos de materia fecal que no muestre un color verde manzana vibrante o morfología característica, debería también ser considerada negativa.

CONTROL DE CALIDAD

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

Para proporcionar un control de calidad de los reactivos contenidos en el kit, se deberían evaluar los Controles Negativo y Positivo cada vez que se procese una muestra de paciente. **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.**

Cada vez que se utilice el kit, los componentes deberían examinarse visualmente por si hubieran señales obvias de contaminación, congelación o derrame.

Se sugiere que los resultados de cada chequeo del control de calidad sean registrados en un libro adecuado para mantener así procedimientos de ensayo de alta calidad y a su vez cumplir con los organismos reguladores.

VALORES ESPERADOS

El test de inmunofluorescencia directa **MERIFLUOR C/G** identificará la presencia de oocitos de *Cryptosporidium* y quistes de *Giardia* en muestras fecales. Típicamente, los pacientes en estado activo de una u otra enfermedad vierten oocitos y quistes, respectivamente, en número de moderado hasta amplio. Algunos pacientes pueden continuar excretando oocitos y quistes en pequeña cantidad después de su recuperación clínica completa.^{2,4}

Las variaciones en el ratio de positividad pueden ser debidas a la edad, localización y al estado general de salud de la población de pacientes bajo estudio.^{1,3}

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

MERIFLUOR C/G es un procedimiento diagnóstico in vitro para la ayuda en el diagnóstico de infección por *Cryptosporidium* y *Giardia*. Aunque la presencia de *Cryptosporidium* y *Giardia* está habitualmente asociada con diarrea y vómitos, se ha observado que individuos asintomáticos vierten oocitos y quistes.^{1,4} Además, la presencia de oocitos y quistes en una muestra fecal no excluye la existencia de otros microorganismos u otro estado subyacente como agente causal de los síntomas de un paciente. Por estas razones, debería considerarse el ensayo concurrente adecuado para determinar otros agentes etiológicos.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Se recibieron muestras de materia fecal conservadas con formalina al 10%, de varios laboratorios de referencia, y se analizaron en un estudio a ciegas (el analista no conocía la identidad de ninguna de las muestras). Las muestras fueron concentradas con el sistema Para-Pak® CON-Trate® y luego teñidas: inmunofluorescencia directa (AID, "DFA") con **MERIFLUOR C/G** (DFA), anticuerpos inmunofluorescentes (AIF, "IFA") con **MERIFLUOR Cryptosporidium** (IFA) y **MERIFLUOR Giardia** (IFA), con tinción ácido alcohol resistente (AAR) modificada por calor y d) con yodo.

- Cryptosporidium.** Las siguientes tablas comparan los resultados de los diferentes procedimientos de tinción para los oocitos de *Cryptosporidium* en 115 muestras de materia fecal. En las muestras que contenían oocitos numerosos, los resultados fueron obtenidos con los tres procedimientos de tinción adecuados. Para las 15 muestras con resultados discrepantes, números bajos de oocitos fueron observados mediante el método de tinción positiva. Para resolver los resultados en muestras discrepantes estas fueron teñidas dos veces más con cada método.

		AAR				Resueltas						AFI ("IFA")				Resueltas			
		+		-		+		-				+		-		+		-	
AID ("DFA")	+	24	13			32	5			AID ("DFA")	+	36	1			37	0		
	-	2	76			1	77				-	0	78			0	78		
Sensibilidad		92%				97%				Sensibilidad	100%				100%				
Especificidad		85%				94%				Especificidad	99%				100%				
Correlación		87%				95%				Correlación	99%				100%				

- Giardia.** Las siguientes tablas comparan los resultados de varios procedimientos de tinción para los quistes de *Giardia* en 115 muestras de materia fecal concentrada. En las seis muestras con resultados discrepantes, números bajos de oocitos fueron observados mediante el procedimiento de tinción positiva. Para resolver los resultados discrepantes estas muestras fueron teñidas por el método de tinción tricrómica utilizando una muestra par conservada con PVA.

		Yodo				Resueltas						AIF ("IFA")				Resueltas			
		+		-		+		-				+		-		+		-	
AID ("DFA")	+	38	4			42	0			AID ("DFA")	+	42	0			42	0		
	-	2	71			0	73				-	0	73			0	73		
Sensibilidad		95%				100%				Sensibilidad	100%				100%				
Especificidad		95%				100%				Especificidad	100%				100%				
Correlación		95%				100%				Correlación	100%				100%				

- Materias fecales no concentradas.** Las muestras fueron teñidas con **MERIFLUOR C/G** directamente del vial con formalina, o inmediatamente después de la concentración de las mismas. De las 32 muestras positivas para *Cryptosporidium* en materia fecal concentrada, dos dieron resultado negativo en la muestra no concentrada. En ambos casos, pocos oocitos fueron observados en la muestra concentrada. Hubo una concordancia total con las 40 muestras positivas para *Giardia*.

REACTIVIDAD CRUZADA

Los siguientes organismos no fluorescieron al ser analizados con **MERIFLUOR C/G**:⁸ *Blastocystis hominis*, *Candida albicans*, *Chilomastix mesnili*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*

DEUTSCH

MERIFLUOR®

CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA

Direkter Immunofluoreszenz-Test zum gleichzeitigen Nachweis von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten in fäkalem Material

REF 250050

IVD In-Vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

MERIFLUOR Cryptosporidium/Giardia (MERIFLUOR C/G) ist ein direkter in-vitro Immunfluoreszenz-Test zum gleichzeitigen Nachweis von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten in fäkalem Material.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Cryptosporidium:

Protozoen der Gattung *Cryptosporidium* werden weltweit angetroffen und rufen bei immunkompetenten Personen eine selbst-limitierende Gastroenteritis hervor. Die Primärsymptome umfassen eine explosive, wässrige Diarrhoe begleitet von Erbrechen, Bauchkrämpfen und leichtem Fieber, das zwei bis vierzehn Tage andauert.^{1,2} Bei immungeschwächten Patienten sind die Symptome schwerer und anhaltender, und können insbesondere bei Patienten mit AIDS zum Tod führen.^{1,2} Versuche, ein wirksames Chemotherapeutikum zu finden, sind bisher erfolglos geblieben.

Cryptosporidium sp. wurden bei verschiedenen Haustieren sowie bei Geflügel, Kälbern, Lämmern und Ziegen gefunden. Über die erste Isolierung von *Cryptosporidium* aus einem Menschen wurde 1976 berichtet. Obwohl mehrere Arten beschrieben wurden, wurde eine nur geringe Wirtsspezifität angegeben.^{1,2} Der Organismus ist klein (2-6 µm) und kugelig. Der Parasit vermehrt sich innerhalb des Mikrovillussystems des Darms, obwohl sein Auftreten an anderen Stellen ebenfalls beschrieben wurde.^{1,2} Die infektiösen Oozysten werden mit den Fäkalien vom Wirt ausgeschieden. Die fäkal-orale Kontamination ist der wahrscheinlichste Übertragungsweg.^{1,2}

Durch eine frühe Diagnose von Cryptosporidiose aus fäkalem Material können invasive Eingriffe vermieden und unterstützende Maßnahmen erleichtert werden. Obwohl verschiedene Methoden zum Nachweis von Oozysten in Fäkalien beschrieben wurden, ist die modifizierte säurefeste Färbung das gebräuchlichste Verfahren.¹ Die Säurefestigkeit der Oozysten machen die Unterscheidung von anderen säurefesten Organismen vergleichbarer Größe schwierig.

Giardia:

Die Gardiasis ist eine der häufigsten intestinalen Parasiten-Infektionen der Welt.³ Die Primärquellen sind kontaminierte Nahrung und unbehandeltes Oberflächenwasser, das mit Zysten-haltigem Tierkot verunreinigt ist, in Verbindung mit einer unzureichenden Filtration in den Wasseraufbereitungsanlagen.^{3, 4} Darüber hinaus zählen Gesundheitsbehörden die Gardiasis zu den sexuell übertragbaren Krankheiten.³

Organismen der Gattung *Giardia* wurden zum erstenmal in 1675 von Antony van Leeuwenhoek beobachtet.³ *Giardia* sp. sind Protozoen-Flagellaten, die in zwei Formen vorkommen: 1) bewegliche und aktiv fressende Trophozoiten (9-21 µm lang und 5-15 µm breit), die an der Oberfläche des Dünndarms gefunden werden; 2) infektiöse ovale Zysten, die kleiner sind (8-12 µm lang und 7-10 µm breit) und zwei bis vier Kerne enthalten.^{3,4}

Die klinische Manifestation der *Giardia*-Infektion reicht von der asymptomatischen Ausscheidung von Zysten mit nur leichten gastrointestinalen Beschwerden bis zu schweren akuten Fällen mit explosiver, wässriger und übelriechender Diarrhoe und Bauchkrämpfen, Blähungen, Anorexie und Übelkeit.^{3, 4} Obwohl manche Fälle selbstlimitierend sind, können die Symptome einer akuten oder subakuten Infektion mehrere Tage bis mehrere Monate anhalten.^{3, 4} Zur medikamentösen Therapie wird sowohl für asymptomatische Ausscheider von Zysten als auch für symptomatische Patienten Quinacrin Hydrochlorid, Metronidazol, und Furazolidon empfohlen.^{3,4}

Die klinische Diagnose der Gardiasis wird routinemäßig durch die direkte mikroskopische Untersuchung von Stühlen oder Stuhlkonzentraten auf das Vorkommen von Zysten und/oder Trophozoiten gestellt. Konventionelle Färbemethoden erreichen eine Sensitivität von 50-70%: niedrigere Raten wurden beobachtet, wenn nur geringe Konzentrationen von Zysten vorhanden waren.^{4,5} Durch die Untersuchung von Aspiraten der Duodenal- und Jejunal-Flüssigkeit und von Biopsieproben aus dem Dünndarm wird die Sensitivität konventioneller Methoden verbessert, aber diese Untersuchungen sind invasiv und teuer. Andere Methoden umfassen die Serodiagnose durch Immunfluoreszenz-Tests und ELISAs, keine dieser Techniken zeigt jedoch eine aktive *Giardia*-Infektion an.^{4,5}

Ein Zusammenhang zwischen *Cryptosporidium* und *Giardia*-Infektionen ist bisher nicht gezeigt worden. Über zahlreiche Fälle von Koinfektionen mit beiden Organismen wurde jedoch berichtet.⁶

Der direkte Immunfluoreszenz-Test **MERIFLUOR C/G** weist *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten in klinischen Proben schnell und genau nach. Die Spezifität der monoklonalen Antikörper gegen *Cryptosporidium* und *Giardia* wird mit der Sensitivität eines direkten Immunfluoreszenz-Tests verbunden. Die Immunfluoreszenz-Technik ist einfach durchzuführen und hat nachweislich eine höhere Sensitivität als herkömmliche Färbemethoden.^{7,8}

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

MERIFLUOR C/G wendet das Prinzip der direkten Immunfluoreszenz an. Das Nachweis-Reagenz enthält eine Mischung von FITC-markierten monoklonalen Antikörpern, die gegen die Zellwand-Antigene von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten gerichtet sind. Eine vorbereitete Stuhlprobe wird mit dem Nachweis-Reagenz behandelt und gegengefärbt. Die monoklonalen Antikörper binden an *Cryptosporidium*- und *Giardia*-Antigene in den Proben. Die Objektträger werden gespült, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Ein Deckglas wird mit einem Eindeckmittel aufgebracht, und die Objektträger werden mit einem Fluoreszenzmikroskop auf die apfelgrüne Farbe und die charakteristische Morphologie der *Cryptosporidium*-Oozysten und der *Giardia*-Zysten untersucht. Das Hintergrundmaterial der Probe wird matt orange bis rot gegengefärbt.

REAGENZIEN/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 *Cryptosporidium*- und *Giardia*-Antigene in einer gepufferten Lösung mit Protein-Stabilisator und 0,1% Natriumazid.
2. **Gegenfärb-Reagenz:** Eriochrom-Schwarz-Lösung.
3. **20fach konzentrierter Waschpuffer:** konzentrierter Waschpuffer mit Konservierungsmittel.
4. **Positiv-Kontrolle*:** mit Formalin behandeltes Stuhlpräparat mit *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten mit 0,09% Thimerosal.
5. **Negativ-Kontrolle*:** mit Formalin behandelte Stuhl mit 0,09% Thimerosal.
6. **Eindeckmittel*:** Gepuffertes Glycerol mit Formalin, einem Antiquencher und 0,05% Natriumazid.
7. **Transfer-Ösen**
8. **Präparierte Objektträger**

***ACHTUNG:** Diese Reagenzien enthalten das potentiell krebserregende Formaldehyd.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
2. Spritzflasche
3. Feuchte Kammer
4. Deckgläser (22x50 mm), Dicke Nr. 1
5. Fluoreszenzmikroskop ausgestattet mit einem Filtersystem für Fluorescins-isothiocyanat (FITC) mit den folgenden Spezifikationen: Anregungswellenlänge: 490-500 nm, Emissionsfilter: 510-530 nm
6. Kleiner Spatel

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien und Testbestandteile 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 und das Gegenfärb-Reagenz vor Licht schützen.
5. Alle Reagenzien sollten vor Gebrauch sorgfältig gemischt werden.
6. Die Reagenzfläschchen mit den richtigen Deckeln wieder verschließen.
7. Darauf achten, dass die behandelte Oberfläche beim Aufbringen der Proben oder Reagenzien in die Kavitäten nicht mit der Öse oder dem Spatel zerkratzt wird.
8. Das Eindeckmittel, die Positiv- und die Negativ-Kontrolle enthalten Formalin, das die Haut reizt. Kontakt mit Haut oder Kleidung vermeiden. Bei Kontakt die betroffene Stelle sorgfältig mit Wasser spülen.
9. Die Positiv-Kontrolle enthält mit Formalin abgetötete *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten, sie sollte jedoch als potentiell infektiöse Probe behandelt werden.
10. Die Positiv- und die Negativ-Kontrolle enthalten Formaldehyd, das potentiell kanzerogen ist.
11. Patientenproben können HIV oder andere infektiöse Erreger enthalten und sollten von gut geschultem Personal gehandhabt und als potentiell pathogen entsorgt werden. Sie sollten Einmal-Handschuhe während der Handhabung von Patientenproben und während der Testdurchführung tragen.
12. Proben, die in PVA oder MF/MIF konserviert sind, sind nicht geeignet für den **MERIFLUOR C/G** Test. Mit Formalin oder SAF und EcoFix® konservierte Proben können eingesetzt werden.
13. Wenn beim Mikroskopieren der Kavitäten auf dem Objektträger kein Stuhlmaterial zu sehen ist, kann das Probenmaterial verloren gegangen sein. Dies ist gewöhnlich auf ein zu kräftiges Waschen oder eine ungenügende Trockenzeit für die Probe zurückzuführen.

WARNUNG: Einige Reagenzien dieses Test-Kits enthalten Natriumazid, das hautreizend wirkt. Sie sollten einen Hautkontakt mit Reagenzien 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.

GEFAHREN - UND SICHERHEITANGABEN

GEGENFÄRBEREAGENZ: GIFTIG – DIMETHYLFORMAMID

R-SÄTZE:

61 Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

S-SÄTZE:

45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort einen Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

NACHWEISANTIKÖRPER: GESUNDHEITSSCHÄDLICH – NATRIUMAZID

R-SÄTZE:

22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

32 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

20 fach konzentrierter Waschpuffer: GESUNDHEITSSCHÄDLICH – NODIUM O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

R-SÄTZE:

33 Gefahr kumulativer Wirkungen.

20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut.

S-SÄTZE:

36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

NEGATIV-KONTROLLE, POSITIV-KONTROLLE: GESUNDHEITSSCHÄDLICH – FORMALDEHYD / NODIUM O-(ETHYLMERCURITHIO)BENZOATE (THIMEROSAL)

R-SÄTZE:

33 Gefahr kumulativer Wirkungen.

40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.

43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut.

S-SÄTZE:

36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

EINDECKMITTEL - GESUNDHEITSSCHÄDLICH – FORMALDEHYD

R-SÄTZE:

40 Verdacht auf krebserzeugende Wirkung.

43 Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.

S-SÄTZE:

36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen.

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Haltbarkeitsdatum des **MERIFLUOR C/G** Tests 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.**

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

1. Den gesamten Test-Kit vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
2. Stellen Sie soviel einfach konzentrierten Waschpuffer her wie nötig: z. B. 2,5 mL des 20fachen Waschpuffer-Konzentrats + 47,5 mL destilliertes oder deionisiertes Wasser. Nicht benötigter einfach konzentrierter Waschpuffer kann bei Raumtemperatur bis zu drei Monate lang aufbewahrt werden.

PROBENNAHME UND - VORBEREITUNG

1. Es sollten Stuhlproben, die in 10% Formalin, Natriumacetat-Essigsäure-Formalin (SAF) oder EcoFix® konserviert wurden, verwendet werden. Die Mischung Konservierungsmittel/Probe sollte 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden, um eine ausreichende Fixierung sicherzustellen. **MERIFLUOR C/G** wurde zum Gebrauch zusammen mit der Para-Pak®-Produktlinie für die Parasitologie entwickelt. Die Proben werden, wie in der jeweiligen, dem Abnahmesystem beiliegenden Para-Pak®-Packungsbeilage angegeben gewonnen. Entsprechende Para-Pak®, Formalin- oder SAF-Packungsbeilagen können bei Meridian Bioscience angefordert werden.
2. Um die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises in Stühlen mit niedrigen Konzentrationen von Zysten und Oozysten zu erhöhen, können die Proben vor der Testdurchführung aufkonzentriert werden (siehe **LEISTUNGSMERKMALE**): Die Para-Pak® Macro-CON®- und Para-Pak® CON-Trate®-Systeme werden hierfür empfohlen. Das Entfernen von fäkalen Lipiden durch Ethylazetat kann, insbesondere wenn die Stuhlprobe schleimig ist, ein Vorteil sein. Die Entfettung verbessert das Anhaften des Stuhlmateriale an den präparierten Objektträger.

TESTDURCHFÜHRUNG

1. Mit einer Transfer-Öse einen Tropfen fäkalen Materials auf eine präparierte Kavität eines Objektträgers aufbringen. Die Probe über die gesamte Kavität ausbreiten. Die präparierte Oberfläche des Objektträgers nicht zerkratzen.
2. Mit einer neuen Transfer-Öse einen Tropfen der Positiv-Kontrolle in eine andere Kavität geben. Die Positiv-Kontrolle über die gesamte Kavität ausbreiten. Die präparierte Oberfläche des Objektträgers nicht zerkratzen.
3. Mit einer neuen Transfer-Öse einen Tropfen der Negativ-Kontrolle in eine andere Kavität geben.
4. Die Objektträger an der Luft bei Raumtemperatur vollständig trocknen lassen (dauert normalerweise 30 Minuten).
5. Einen Tropfen Nachweis-Reagenz in jede Kavität geben.
6. Einen Tropfen Gegenfarbe-Reagenz in jede Kavität geben.
7. Die Reagenzien mit einem kleinen Spatel verrühren und über die gesamte Kavität ausbreiten. Die präparierte Oberfläche des Objektträgers nicht zerkratzen.
8. Die Objektträger in einer feuchten Kammer 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. **Achtung: vor Licht schützen.**
9. Benutzen Sie eine Waschflasche, um die Objektträger mit einem leichten Strahl einer konzentrierten Puffers abzuspülen, bis überschüssiges Nachweis-Reagenz und Gegenfarbe-Reagenz entfernt ist. **Achtung: die Objektträger während des Spülens nicht eintauchen.** Vermeiden Sie es, Probenmaterial abzuspülen oder die Proben gegenseitig zu verunreinigen.
10. Überschüssigen Puffer durch leichtes Aufklopfen der langen Seite des Objektträgers auf ein sauberes Papiertuch entfernen. **Achtung: die Objektträger nicht trocken lassen.**
11. Einen Tropfen Eindeckmittel auf jede Kavität geben und ein Deckglas auflegen.
12. Jede Kavität sorgfältig bei einer 100-200fachen Vergrößerung absuchen. Das Vorkommen von *Cryptosporidium*-Oozysten sollte bei einer stärkeren Vergrößerung bestätigt werden.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Kontrollreaktionen:

1. *Cryptosporidium*-Oozysten haben eine runde bis leicht ovale Form und 2-6 µm Durchmesser. Die Oozysten-Zellwand färbt sich in einem hellen Apfelgrün. Eine feine Naht kann ebenfalls sichtbar sein.
2. *Giardia*-Zysten sind ovale Organismen und 8-12 µm lang. Die Zystenwand färbt sich in einem hellen Apfelgrün.
3. Das Hintergrundmaterial sollte matt orange bis rot gegengefärbt sein.
4. Die Kavität der Negativ-Kontrolle sollte keine apfelgrün fluoreszierenden, charakteristisch geformten Zysten oder Oozysten aufweisen.
5. Eine leichte Hintergrundfärbung kann manchmal als ein Artefakt der Vorbereitung der Objektträger auftreten. Diese Hintergrundfluoreszenz ist durch das Fehlen der kräftigen, apfelgrünen Farbe oder der charakteristischen Morphologie der Zysten leicht zu erkennen.

Patientenproben:

1. **Cryptosporidium-positives Test-Ergebnis:** Jede Stuhlprobe, die eine oder mehrere Oozysten mit der apfelgrünen Farbe und der charakteristischen Morphologie aufweist, sollte als positiv bezüglich des Vorkommens von *Cryptosporidium* sp. angesehen werden.
2. **Giardia-positives Test-Ergebnis:** Jede Stuhlprobe, die eine oder mehrere Zysten mit der apfelgrünen Farbe und der charakteristischen Morphologie aufweist, sollte als positiv bezüglich des Vorkommens von *Giardia* angesehen werden.
3. **Negatives Test-Ergebnis:** Eine Stuhlprobe ohne apfelgrüne Fluoreszenz sollte als negativ bezüglich des Vorkommens von *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten angesehen werden. Fluoreszierende Bruchstücke im Hintergrund, die nicht kräftig apfelgrün sind oder nicht die charakteristische Morphologie aufweisen, sollten als negativ angesehen werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

Jedesmal, wenn Patientenproben analysiert werden, sollten Positiv- und Negativ-Kontrollen mitlaufen, um die Qualität der Reagenzien des Test-Kits zu überprüfen. 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.

Bei jedem Gebrauch sollten die Test-Bestandteile auf offensichtliche Anzeichen von mikrobiellen Verunreinigungen, Vereisungen oder Undichtigkeiten untersucht werden.

Zu einem hohen Test-Qualitäts-Standard gehört, dass – wie wir es empfehlen – die Ergebnisse jeder Qualitätskontrolle in einem geeigneten Laborjournal aufgezeichnet und so behördliche Vorgaben erfüllt werden.

ERWARTETE WERTE

Der **MERIFLUOR C/G** –Test ist ein direkter Immunfluoreszenz-Test, der *Cryptosporidium*-Oozysten und *Giardia*-Zysten in Stuhlproben nachweist. Patienten im aktiven Zustand einer der Erkrankungen scheiden gewöhnlich Oozysten bzw. Zysten in mäßigen bis großen Konzentrationen aus. Einige Patienten scheiden nach ihrer völligen klinischen Wiederherstellung weiter Oozysten oder Zysten in kleinen Konzentrationen aus.^{2,4} Schwankungen der Positivraten sind zu erwarten in Abhängigkeit vom Alter, dem Ort und den allgemeinen Gesundheitsbedingungen der untersuchten Patientenpopulation.^{1,3}

EINSCHRÄNKUNGEN

Der **MERIFLUOR C/G** –Test ist ein diagnostisches in-vitro Verfahren, das die Diagnose von *Cryptosporidium*- und *Giardia*-Infektionen unterstützen soll. Während das Vorkommen von *Cryptosporidium* oder *Giardia* oft mit Diarrhoe und Erbrechen verbunden ist, wurde eine Oozysten- und Zystenabscheidung bei asymptomatischen Personen beobachtet.^{1, 4} Darüberhinaus schließt das Vorkommen von Oozysten und Zysten in Stuhlproben nicht aus, dass die Symptome der Patienten durch das Auftreten anderer Mikroorganismen oder anderer zugrundeliegender Erkrankungen ausgelöst wird. Daher sollten geeignete, gleichzeitige Tests zur Überprüfung anderer Ursachen in Erwägung gezogen werden.

LEISTUNGSMERKMALE

In einer Blindstudie wurden Stuhlproben, die in 10% Formalin konserviert wurden und aus verschiedenen Referenz-Laboren stammten, analysiert. Die Proben wurden mit dem Para-Pak® CON-Trate® System konzentriert und mit **MERIFLUOR C/G** (DFT), **MERIFLUOR Cryptosporidium** (IFT), **MERIFLUOR Giardia** (IFT), mit einer heißen modifizierten Säure-Fixierung und Jod gefärbt.

1. Cryptosporidium

Die folgenden Tabellen vergleichen die Ergebnisse der verschiedenen Färbemethoden bei *Cryptosporidium* Oozysten in 115 Stühlen. Bei Proben mit einer großen Anzahl von Oozysten wurden positive Ergebnisse mit den drei relevanten Färbemethoden erzielt. Bei den 15 Proben mit abweichenden Ergebnissen wurde mit der positiven Färbemethode jeweils eine kleine Oozysten-Anzahl beobachtet. Um die abweichenden Ergebnisse endgültig zu beurteilen, wurden diese Proben mit jeder Methode zusätzlich zweimal gefärbt.

	Säure-Fixierung		Endgültige Bewertung		IFT		Endgültige Bewertung	
	+	-	+	-	+	-	+	-
DFT +	24	13	32	5	36	1	37	0
DFT -	2	76	1	77	0	78	0	78

Sensitivität	92%	97%	Sensitivität	100%	100%
Spezifität	85%	94%	Spezifität	99%	100%
Korrelation	87%	95%	Korrelation	99%	100%

2. Giardia

Die folgenden Tabellen vergleichen die Ergebnisse der verschiedenen Färbemethoden für *Giardia* Zysten bei 115 konzentrierten Stuhlproben. Bei den sechs Proben mit abweichenden Ergebnissen wurden niedrige Zystenanzahlen mit der positiven Färbemethode beobachtet. Um die abweichenden Ergebnisse endgültig zu bewerten, wurden diese Proben mit der trichromen Farbe-Methode gefärbt, dabei wurde die mit PVA konservierte Probe in zwei Aliquots aufgeteilt.

	Jod		Endgültige Bewertung		IFT		Endgültige Bewertung	
	+	-	+	-	+	-	+	-
DFT +	38	4	42	0	42	0	42	0
DFT -	2	71	0	73	0	73	0	73

Sensitivität	95%	100%	Sensitivität	100%	100%
Spezifität	95%	100%	Spezifität	100%	100%
Korrelation	95%	100%	Korrelation	100%	100%

3. Nicht konzentrierte Stühle

Die Proben wurden mit **MERIFLUOR C/G** direkt aus dem Formalin-Fläschchen oder nach dem Aufkonzentrieren gefärbt. Zwei von 32 Proben, waren im konzentrierten Stuhl *Cryptosporidium*-positiv und negativ in nichtkonzentrierten Proben. In beiden Fällen wurden in den konzentrierten Proben nur wenige Oozysten beobachtet. Bei 40 *Giardia*-positiven Proben wurde eine vollständige Übereinstimmung beobachtet.

KREUZREAKTIVITÄT

Die folgenden Organismen fluoreszierten nicht, wenn sie mit **MERIFLUOR C/G** getestet wurden.⁸

Blastocystis hominis, *Candida albicans*, *Chilomastix mesnili*, *Dientamoeba fragilis*, *Endolimax nana*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba histolytica*, *Iodamoeba butschlii*, *Strongyloides stercoralis*, *Trichomonas hominis*, *Trichomonas vaginalis*

REFERENCES

1. Fayer, R., and Ungar, BLP. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. Microbiol. Rev. 1986; 50:458-483.
2. Janoff, EN., and Reller, LB. *Cryptosporidium* Species, a Protein Protozoan. J. Clin. Microbiol. 1987; 25:967-975.

- Stevens, David P., Selective Primary Health Care: Strategies for Control of Disease in the Developing World. XIX. Giardiasis. Rev. Inf. Dis. 1985; 7:530-535.
- Dupont, L. and Sullivan, PS. Giardiasis: The Clinical Spectrum, Diagnosis and Therapy. Ped. Inf. Dis., 1986; 86:S131-138.
- Ungar, BLP., Yolken, RH. Nash, TE. and Quinn, TC. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of *Giardia lamblia* in Fecal Specimens. J. Inf. Dis., 1984; 149:90-97.
- Jokipii, L., Pohjola, S. and Jokipii, AMM. *Cryptosporidiosis* Associated with Traveling and Giardiasis. Gastroenterol. 1985; 89:838-842.
- Garcia, LS., Brewer, TC. and Bruckner, DA. Fluorescence Detection of *Cryptosporidium* oocysts in Human Fecal Specimens by Using Monoclonal Antibodies. J. Clin. Microbiol. 1987; 25:119-121.
- Data on file, Meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, OH 45244.



SN11220

REV. 02/13

 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
 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@mdeur.com

Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v.
 Rue de l'Industrie 7
 1400 Nivelles
 Belgium
 Tel.: +32 (0) 67 89 59 59
 Fax: +32 (0) 67 89 59 58
 e-mail: info@mdeur.be

Meridian Bioscience Europe b.v.
 Halderheiweg 6
 5282 SN Boxtel
 The Netherlands
 Tel.: +31 (411) 621166
 Fax: +31 (411) 624841
 e-mail: meridian.info@planet.nl

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

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 symboles, 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-diagnostici 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 Probenzubereitung, 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 / Gebrauchsweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contiene sufficiente per n' saggi / Contenu suffisant pour n' tests / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Solution de Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Coniugé enzymatique / Coniugado 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 / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Coniugado / Coniugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / 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 tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
		DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / 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.