

merifluor®

Pneumocystis

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

REF 222030

IVD

Rx Only

INTENDED USE

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

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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

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

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

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

BIOLOGICAL PRINCIPLES

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

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

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

MATERIALS NOT PROVIDED


1. *P. carinii* positive control slides of human origin
2. *P. carinii* negative control slide
3. Centrifuge
4. Humidity chamber
5. Wash bottle
6. Microscope slide coverslips
7. Acetone, reagent grade (store in tightly closed container to prevent absorption of water).
8. 35-37 C incubator
9. Deionized water or tap water
10. Pipettes
11. Dithiothreitol
12. Fluorescence microscope, equipped with a filter systems for fluorescein isothiocyanate (FITC) with the following parameters: Excitation wavelength - 490-500, Barrier filter - 510-530.

PRECAUTIONS

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

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

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

 Mounting Medium	Signal Word Danger Hazard Statements H317 – May cause an allergic skin reaction H341 – Suspected of causing genetic defects H350 – May cause cancer Contains Formaldehyde Precautionary Statements - EU (S28, 1272/2008) P280 – Wear eye protection/face protection P280 – Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. P201 – Obtain special instructions before use P308 + P313 – IF exposed or concerned: Get medical advice/attention P321 – See SDS Section 4 or Section 11 for additional medical treatment information
--	--

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use. **CAUTION: DO NOT FREEZE.**

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

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

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

A. Preparation of BW and BAL Specimens

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

B. Preparation of IS Specimens

- Induced sputum specimens can be processed by preparing smears directly from sputa. However, increased recovery can be obtained by concentration after liquefaction of the sputa with dithiothreitol.^{11, 13}
1. Direct smears from IS.
 - a. With an applicator stick, gather all the opaque, white or cream-colored flecks of material present in the specimen to the periphery of the specimen.
 - b. Remove the flecks with a transfer pipette and place them on the appropriate well of a microscope slide.
 - c. Spread these flecks and their associated material over the well using the side of the transfer pipette.
 - d. Continue immediately with staining (see **PROCEDURE**).

C. Preparation of Biopsy Specimens

- Transbronchial, open lung, or other biopsy specimens must not be formalin-fixed.** Transport specimen in a container on gauze slightly moistened with saline. The tissue should not be immersed in saline nor allowed to dry as either condition can result in poor touch preparations.
1. Prepare a freshly cut surface on a fragment of tissue. Touch the cut surface of the specimen to an appropriately labeled microscope slide. Make several non-overlapping imprints within the well, avoiding smearing. The use of several cut surfaces will increase the opportunity to detect *P. carinii* organisms.
 2. While imprints are still moist on the slide, fix by adding 1-2 drops of acetone and allow to air dry completely. Proceed with step 2 of **PROCEDURE**.

PREPARATION OF POSITIVE CONTROL

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

TEST PROCEDURE

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

INTERPRETATION OF RESULTS

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

QUALITY CONTROL

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

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

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

EXPECTED VALUES

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

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

Table 1

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

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

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

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

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

merifluor®

Pneumocystis

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

REF 222030

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

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

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

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

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

Actuellement, le diagnostic clinique de la pneumonie à *P. carinii* est basé sur des données radiologiques et une observation microscopique directe des échantillons pulmonaires utilisant des techniques non spécifiques.^{1,9} Des techniques de coloration non spécifiques, telles que l'imprégnation à l'argent ou la coloration au Bleu de Toluidine O, colorent les parois du kyste, mais ne mettent pas en évidence les trophozoïtes ou les sporozoïtes.^{1,9} Etant donnée la nature non spécifique de ces colorations, l'identification correcte de ces organismes était difficile.¹⁰

¹³ La détection de *P. carinii* dans les produits de lavage broncho-alvéolaire, d'expectoration, et de biopsie pulmonaire, a été finalement réalisée par un test d'immunofluorescence.^{11,12,13}

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

PRINCIPE DU TEST

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

MATERIEL FOURNI

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

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

MATERIEL NON FOURNI

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

PRECAUTIONS D'EMPLOI

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

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

DANGER ET MISES EN GARDE

Mounting Medium

Mention d'avertissement

Danger

Mentions de danger

H317 – Peut provoquer une allergie cutanée

H341 – Susceptible d'induire des anomalies génétiques

H350 – Peut provoquer le cancer

Contient Formaldéhyde

Conseils de prudence – UE (S28, 1272/2008)

P280 – Porter un équipement de protection des yeux/du visage

P280 – Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.

P201 – Se procurer les instructions avant utilisation

P308 + P313 – EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin

P321 – See SDS Section 4 or Section 11 for additional medical treatment information

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGELa date d'expiration est indiquée sur les étiquettes du coffret. Le coffret doit être conservé à 2-8 C et remis au réfrigérateur après chaque usage. **ATTENTION: NE PAS CONGELER****PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS**

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

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

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

A. Préparation des échantillons LA et LB**1. Méthode de centrifugation**

- Les échantillons doivent être concentrés pour augmenter la récupération de *P. carinii*. Mélanger les échantillons minutieusement, transférer un volume minimum de 5 mL dans des tubes à centrifugation et centrifuger à 1 800 g pendant 10 minutes. Éliminer le surnageant en laissant 0,5 mL de liquide. Resuspendre minutieusement le culot dans ces 0,5 mL de liquide restant.
- Prélever 25-50 µL de l'échantillon resuspendu à l'aide d'une pipette de transfert (la graduation la plus proche de la pointe correspond à 50 µL) et placer le volume dans le puits approprié de la lame de microscope.
- Étaler l'échantillon sur toute la surface du puits en utilisant la pipette de transfert.
- Poursuivre immédiatement par l'étape de coloration (voir la section **PROCEDURE**).

2. Méthode Shandon Cytospin™ 2

- La procédure de concentration peut être omise en centrifugeant 0,5-0,6 mL de LA ou LB non concentré à 900 rpm pendant 5 minutes en utilisant 1 filtre blanc et 1 filtre foncé. La graduation la plus proche de la poire de la pipette de transfert (fournie avec le coffret) correspond à 0,3 mL.
- Poursuivre immédiatement par l'étape de coloration (voir la section **PROCEDURE**).

B. Préparation des échantillons d'expectoration (EX)Les échantillons d'expectoration peuvent être préparés en réalisant un frottis direct à partir du crachat. Cependant, une meilleure détection sera obtenue par concentration après liquéfaction du crachat avec du dithiothreitol.^{11,13}**1. Frottis directs des EX**

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

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

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

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

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

INTERPRETATION DES RESULTATS

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

CONTROLE DE QUALITE

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

1. Un échantillon de contrôle positif d'origine humaine doit être obtenu afin de vérifier les performances propres du test.
 2. A chaque utilisation, les composants du coffret doivent être examinés afin de visualiser tous signes de contamination, de congélation ou d'agrégation.
- Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.**

VALEURS ATTENDUES

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

LIMITES DU TEST

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

PERFORMANCES DU TEST

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

Tableau 1

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

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

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

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

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

merifluor®

Pneumocystis

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

REF 222030

IVD

Rx Only

USO INDICADO

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

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

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

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

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

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

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

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

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

1. **Reactivo de Detección** - Anticuerpos monoclonales anti-*P. carinii* marcados con FITC en una solución tamponada que contiene proteína, Azul de Evans y 0,07% de azida de sodio.
2. **Líquido de Montaje** - Solución tamponada de glicerol que contiene un agente para prolongar la fluorescencia y 0,05% de azida de sodio.
3. **Láminas portaobjetos**
4. **Pipetas de transferencia**

MATERIALES NO PROPORCIONADOS


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

PRECAUCIONES

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

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

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

 Mounting Medium	Palabra de advertencia Peligro Indicaciones de peligro H317 – Puede provocar una reacción alérgica en la piel H341 – Se sospecha que provoca defectos genéticos H350 – Puede provocar cáncer Contiene Formaldehído Consejos de prudencia – UE (S28, 1272/2008) P280 – Llevar gafas/máscara de protección P280 – Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. P201 – Pedir instrucciones especiales antes del uso P308 + P313 – EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico P321 – See SDS Section 4 or Section 11 for additional medical treatment information
--	---

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta del kit. Almacenar el kit a 2-8 C y colocarlo de nuevo en el refrigerador inmediatamente después de cada utilización.

PRECAUCIÓN: NO CONGELAR

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

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

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

A. Preparación de muestras de BW y BAL

1. Método de centrifugación

- Las muestras deben ser concentradas para aumentar la probabilidad de recuperación de *P. carinii*. Mezcle la muestra concienzudamente, transfiera un mínimo de 5 mL a un tubo de centrifuga y centrifugue a 1,800 xg durante 10 minutos. Remueva y deseche todo menos 0,5 mL de sobrenadante. Resuspenda cuidadosamente el sedimento en el resto 0,5 mL de fluido de sobrenadante.
- Remueva entre 25-50 µL de la muestra resuspendida con una pipeta de transferencia (la marca más cercana a la punta es de 50 µL) y colóquela en el pozo adecuado de una lámina portaobjetos.
- Extienda la muestra sobre el pozo usando el lado de la pipeta de transferencia.
- Continúe inmediatamente con la tinción (vea el **PROCEDIMIENTO**)

2. Método Cytospin[®] 2 de Shandon

- El procedimiento de concentración puede ser omitido centrifugando entre 0,5-0,6 mL de solución no concentrada de **BAL** o de **BW** a 900 rpm/5 minutos usando un filtro blanco y uno de color crema. La marca más cercana al mango de la pipeta de transferencia (proporcionada con el kit) es la de 0,3 mL.
- Continúe inmediatamente con la tinción (vea el **PROCEDIMIENTO**).

B. Preparación de muestras de Espudo Inducido (IS)

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

1. Frotis directos a partir de IS.

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

C. Preparación de muestras de Biopsias

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

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

PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO

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

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

CONTROL DE CALIDAD

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

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

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

VALORES ESPERADOS

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

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

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

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

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

Tabla 1

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

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


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

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

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

REFERENCIAS











- MacFarlane, JT and RG Finch, Pneumocystis carinii pneumonia 1985; Thorax 40: 561-570.
- Walzer, PD, DP Perl, DJ Krogstad, PG Rawson, and MG Schultz. Pneumocystis carinii pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic and clinical features. Ann.Intern.Med 1974; 80:83-93.
- Stagno, S., LL Pifer, WT Hughes, DM Brasfield and RE Tiller. Pneumocystis carinii pneumonitis in young immunocompetent infants. Pediatrics 1980; 66:56-62.
- Hughes, WT, RA Price, H Kim, TP Coburn, D Girgsby and S Feldman. Pneumocystis carinii pneumonitis in children with malignancies. J.Pediatr.1973; 82:404-415.
- Pifer, LL, HB Niell, BJ Morrison, JD Counce, Jr, JM Freeman, DR Woods and CL Neely. Pneumocystis carinii antigenemia in adults with malignancy, infection, or pulmonary disease. J.Clin.Microbiol 1984; 20:887-890.
- Hardy, AM, CP Wajszczuk, AF Suffredini, TR Hakala and M Ho. Pneumocystis carinii pneumonia in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and steroids. J.Infect.Dis. 1984; 149:143-147.
- Brenner, M, FP Ognibene, EE Lack, JT Simmons, AF Suffredini, HC Lane, AS Fauci, JE Parrillo, JH Shelhamer and H Masur. Prognostic factors and life expectancy of patients and acquired immunodeficiency syndrome and Pneumocystis carinii pneumonia. Am.Rev.Respir.Dis. 1987; 136:1199-1206.
- Posner, D and FA Kahn. Respiratory infection in AIDS: A comprehensive care approach. J.Respir.Dis. 1987; 8:83-94.
- Hughes, WT In Pneumocystis carinii Pneumonitis. Vol 1&2 CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1987; p 9-32.
- Milder, JE PD Walzer, JD Coonrod and ME Rudledge. Comparison of histological and immunological techniques for detection of Pneumocystis carinii rat bronchial lavage fluid. J.Clin.Microbiol. 1980; 11:409-417.
- Lim, SK, WC Eveland and RJ Porter. Direct fluorescent-antibody method for the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonitis from sputa or tracheal aspirates from humans. Appl.Microbiol. 1974; 27:144-149.
- Gill, VJ, G Evans, F Stock, JE Parrillo, H Masur and JA Kovacs. Detection of Pneumocystis carinii by fluorescent antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. J.Clin.Microbiol. 1987;25:1837-1840.
- Kovacs, JA, V Ng, H Masur, G Leoung, WK Hadley, G Evans, HC Lane, FP Ognibene, J Shelhamer, JE Parrillo and VJ Gill. Diagnosis of Pneumocystis carinii: Improved detection in sputum using monoclonal antibodies. N.Eng.J.Med. 1988; 318:589-593.

 <p>Manufactured By</p>	<p>Meridian Bioscience, Inc. 3471 River Hills Drive Cincinnati, OHIO - 45244 USA www.meridianbioscience.com</p> <p><u>Contacts:</u> Main Telephone (+1) 513.271.3700 Customer Service/Orders 800.543.1980 Technical Support Center 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124 E-mail: info@meridianbioscience.com</p>
<p>AUSTRALIAN SPONSOR</p>	<p>Emergo Australia Level 20, Tower II Darling Park 201 Sussex Street Sydney, NSW 2000 Australia</p>

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

Key guide to symbols (Guide des symboles, Guía de símbolos)

	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
CE	This product fulfils 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 Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Eingrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / 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 / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for n tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para n ensayos / Inhalt ausreichend für n Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant 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
R. Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete esta dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß

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.