



PNEUMO CEL

FIGURE 1: PNEUMO CEL DIAGRAM FOR USE

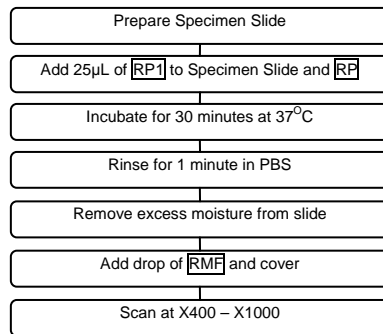


TABLE 1: SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE PNEUMO CEL

TABEAU 1: SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ ET AUTRES DONNÉES DU TEST PNEUMO CEL
 TABELLE 1: SENSITIVITÄT, SPEZIFITÄT UND ANDERE DATEN ZUM PNEUMO CEL
 TABELLA 1: SENSIBILITA', SPECIFICITA' ED ALTRI DATI SULLA PNEUMO CEL
 TABLA 1: SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y OTROS DATOS DEL PNEUMO CEL
 TABELA 1: SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, & OUTROS DADOS DO PNEUMO CEL

| Trial Essai Versuch Prova Prueba Teste | Sensitivity Sensibilité Sensitivität Sensibilita' Sensibilidad Sensibilidade | Specificity Spécificité Spezifität Specificita' Especificidad Especificidade | Repeatability Répétabilité Wiederholpräzision Ripetibilita Repetibilidad Repetição | Reproducibility Reproductibilité Reproduzierbarkeit Riproducibilita Reproducibilidad Reprodutibilidade |
|---|---|---|---|---|
| A | 100% | 100% | - | - |
| B | 100% | 100% | - | - |
| C | 100% | 100% | - | - |
| D | 100% | 95.1% | - | - |
| E | - | - | 100% Correlation | 100% Correlation |
| Not cross reactive with / Pas de Réaction Croisée avec / Keine Kreuzreaktionen mit / Non mostra reazione crociata con / No muestra reacción cruzada con / Não apresenta reações cruzadas com: <i>Cryptococcus neoformans, Candida tropicalis, Saccharomyces cerevesiae, Aspergillus niger, Candida krusei, Candida albicans</i> | | | | |

EXPLANATION OF SYMBOLS



Consult Instructions for Use
 Consulter le Mode d'Emploi
 Gebrauchsanweisung
 Consultare le istruzioni per l'uso
 Consultar el manual de instrucciones
 Consultar o Folheto de Instruções



In Vitro Diagnostic Medical Device
 Produit Diagnostique Médical In Vitro
 In-vitro-Diagnostika
 Diagnostico in vitro Dispositivo medico
 Producto Sanitario para Diagnóstico In Vitro
 Produto de Diagnóstico Medico In vitro



Temperature Limitation
 Températures Limites
 Temperaturbegrenzung
 Temperatura limite
 Limite de temperatura
 Temperatura Limitada



Biological Risks
 Risques Biologiques
 Biogefährdung
 Rischi biologici
 Riesgo biológico
 Riscos Biológicos



Manufacturer
 Fabricant
 Hersteller
 Fabricante
 Fabricante
 Fabricante

Cellabs Pty Ltd
 Unit 7, 27 Dale Street (PO Box 421)
 Brookvale, NSW 2100 Australia
 Tel: +61 2 9905 0133 Fax: +61 2 9905 6426
 Web: <http://www.cellabs.com.au>
 Email: sales@cellabs.com.au



Authorised Representative in the EC
 Représentant Autorisé dans la EC
 Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
 Rappresentante Autorizzato nella EC
 Representante autorizado en la EC
 Representante Autorizado na CE

MDCI Ltd
 Arundel House, 1 Liverpool Gardens
 Worthing, West Sussex BN11 1SL
 United Kingdom

Insert Version
 Manuel Version
 Fassung der Packungsbeilage
 Versione Inserto
 Versión del manual de instrucciones
 Versão do folheto de instruções



LP1.11 - PDF
 4th December 2006

INTENDED USE AND PRINCIPLE OF THE TEST

The Pneumo Cel IF Test is a rapid *in vitro* direct immunofluorescence test for the detection of *Pneumocystis carinii* in human specimens. The fluorescein-labelled mouse monoclonal antibody reagent binds specifically to *P. carinii* in the specimen. *P. carinii* display bright green fluorescence with typical morphology.

CONTENTS OF THE KIT

| | RP1 | RP | RMF | KP1 Demo 0.25mL | KP1 Standard 1.25mL | Bulk 5mL |
|--|-----|----|-----|--------------------|------------------------|-------------|
| Pneumo Cel Reagent | | | | 1 | 1 | - |
| Positive Control Slide (Single Use only) | | | | 2.5mL | 2.5mL | - |
| Mounting Fluid | | | | 10 | 50 | 200 |
| Tests | | | | | | |

Materials are supplied ready for use. Store at 2-8°C. Expiry dates are clearly marked on each kit component and on the box. Expiry dates do not change once opened.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Microscope slides with 6-8mm diameter wells; precision pipette for delivering 25µL; acetone for specimen fixation; humid chamber; wash bath; phosphate buffered saline (PBS) for washing step; cover slips; non-fluorescing immersion oil; and fluorescence microscope with filter system for FITC (maximum excitation wavelength 490nm, mean emission wavelength 530nm) and x400-x1000 magnification.

PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only. Do not use after the expiry date shown on the label. If protective packaging is damaged, contact your local distributor and ask for a replacement. Do not mix reagents from different kits. The Pneumo Cel Reagent has been optimised for use with Cellabs Positive Control Slide and Mounting Fluid. Evans Blue dye contained in the test reagent is a possible carcinogen, therefore avoid contact with the skin. Patient specimens and the positive control slide should be handled as though potentially infectious. A Positive Control Slide must be run with each test run. Refer to Material Safety Data Sheet (MSDS) for further information.

SPECIMEN COLLECTION

Clinical specimens should be processed as soon as possible after collection. Induced sputum, bronchial wash, bronchoalveolar lavage and tissue impression smears may be used. The presence of mucous in specimen may prevent adequate staining. Work in a biohazard hood. A positive control slide should be included with each series of test specimens.

Preparation of Induced Sputum Specimens

Prepare 0.3% dithiothreitol (DTT) in distilled water. Mix equal volumes of sputum and DTT solution. Mix vigorously (vortex) to dispense clumps. Incubate for 30 minutes at 37°C. Centrifuge for 5 minutes at 1500g. Decant supernatant. Resuspend pellet in 0.2-0.5mL of PBS and mix vigorously

Preparation of Bronchial Wash and Bronchoalveolar Lavage Specimens

Centrifuge the specimen at 1500g for 10 minutes. Remove the supernatant leaving 0.5mL. Decant supernatant. Resuspend pellet in 0.2-0.5mL of PBS and mix vigorously

PREPARATION OF SLIDES

Apply 25µL to 1 well (0.8cm) slide and air dry. Fix slide for 5 minutes in acetone. If slides are not stained immediately they may be stored below 0°C for several weeks.

INSTRUCTIONS FOR USE

- Add 25µL of RP1 to the fixed specimen and RP, covering well area.
- Incubate the slides at 37°C in a humid chamber for 30 minutes. Do not allow the slides to dry as this may cause non-specific binding.
- Rinse gently in a bath of PBS for one minute.
- Drain slide and remove excess moisture around well with tissue.
- Add a drop of RMF to the slide well. Place a coverslip on top of the drop and remove air bubbles.
- Scan the entire specimen using a fluorescence microscope initially at X400 magnification, then at X1000 for confirmation. Read immediately or store at 2-8°C in the dark for up to 24 hours.

READING AND INTERPRETATION OF RESULTS AND DIAGNOSIS

In contrast to the reddish-brown colour of counter-stained material, the pleomorphic trophozoites of *Pneumocystis carinii* (PC) exhibit an intense apple-green fluorescence, while the thick-walled cysts appear as round bodies stained at the rim in a "halo-like" appearance. The organisms occur either singularly or more commonly in clusters in an extracellular matrix, which is also stained. A test is considered positive if two or more cysts are present. The control specimen should be used as a comparison for the size and appearance of PC organisms. Negative specimens should not display fluorescent organisms of characteristic morphology. Fluorescent material which is not apple green and can be distinguished from typical PC forms should be disregarded.

WASTE DISPOSAL

Dispose of any unused components as biohazardous waste. Where the test reagent has been disposed of in the sink, ensure it is flushed with large quantities of water (as the sodium azide it contains may react with copper/lead plumbing systems). For more information, please refer to the MSDS.

SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE PNEUMO CEL

Refer to summary table at end of insert. All data on the Pneumo Cel can be obtained in the product information sheet. Please ask your local distributor or contact Cellabs.

INDEMNITY NOTICE

Modifications or changes made in the recommended procedure may affect the stated or implied claims. A positive or negative result does not preclude the presence of other underlying causative agents. Cellabs and its agents and distributors shall not be liable for damages under these circumstances.

PNEUMO CEL

PRINCIPE DU TEST ET INDICATIONS D'EMPLOI

Le coffret Pneumo Cel IF est un test *in vitro* par immunofluorescence directe conçu pour détecter et diagnostiquer la présence de *Pneumocystis carinii* dans les échantillons humains. L'anticorps monoclonal de souris marqué à la fluorescéine se lie spécifiquement aux *P. carinii* de l'échantillon. *P. carinii* fluorescent d'un vert intense et démontrent leur morphologie typique.

COMPOSITION DU COFFRET

| | | KP1 Demo | KP1 Standard | Bulk |
|------------|--|-----------|--------------|------------|
| RP1 | Réactif Pneumo Cel | 0.25mL | 1.25mL | 5mL |
| RP | Contrôle Positif sur lame (réactif à usage unique) | 1 | 1 | - |
| RMF | Liquide de Montage | 2.5mL | 2.5mL | - |
| | <i>Déterminations</i> | <i>10</i> | <i>50</i> | <i>200</i> |

Conserver à 2-8°C. Les dates de péremption sont clairement indiquées sur chaque composant et sur l'étiquette du coffret, et ne sont pas affectées par l'ouverture du coffret.

MATERIELS REQUIS NON FOURNIS

Lames à spots diamètre 6-8 mm; pipette de 25 µL; acétone pour fixation des échantillons; chambre humide; bain de lavage des lames; tampon P.B.S. pour lavage; lamelles couvre objets; huile à immersion non fluorescente; microscope à fluorescence pour FITC (490/530 nm), grossissement 400 à 1000.

PRECAUTIONS

Produit à usage uniquement *in vitro*. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Si l'emballage est abîmé, contactez votre fournisseur local pour un remplacement. Ne pas mélanger les composants de coffrets différents. Pneumo Cel est optimisé pour l'emploi des lames de contrôle et du liquide de montage fournis par Cellabs. Le Bleu d'Evans contenu dans le réactif est un carcinogène potentiel, donc évitez tout contact avec la peau. Les lames de contrôle positives ainsi que les échantillons patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Une Lame de Contrôle Positive doit être préparée pour chaque série de tests afin d'en vérifier la qualité. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

COLLECTION DES ECHANTILLONS

Les spécimens cliniques doivent être analysés dès que possible après leur prélèvement. On peut utiliser du sputum induit, du lavage bronchial ou broncho alvéolaire ou des impressions de tissu sur lame. La présence de mucus dans l'échantillon peut empêcher une coloration adéquate. Travaillez sous hotte à flux laminaire. Une lame de contrôle doit être incluse avec chaque série de spécimens à analyser.

Préparation de spécimens de sputum induit

Préparer une solution à 0.3% de DTT (dithiothreitol) à l'eau distillée. Mélanger sputum et solution DTT à volume égal. Mélanger vigoureusement (vortex) pour émulsionner la solution. Incuber 30 minutes à 37°C. Centrifuger 5 minutes à 1500g. Décanter le surnageant. Suspendre le culot dans 0.2-0.5 mL de P.B.S. et mélanger vigoureusement.

Préparation de spécimens de lavage bronchial ou broncho alvéolaire

Centrifuger le spécimen 10 minutes à 1500g. Jeter le surnageant, en laissant 0.5 mL. Décanter le surnageant restant. Suspendre le culot dans 0.2-0.5 ml de P.B.S. et mélanger vigoureusement.

PREPARATION DES LAMES

Déposer 25 µL sur le spot (8 mm) d'une lame microscopique et laisser sécher à l'air. Fixer à l'acétone pendant 5 minutes. Si la lame n'est pas traitée immédiatement, elle peut être conservée à 0°C pendant plusieurs semaines.

MODE D'EMPLOI

- Déposez 25 µL de **RP1** sur le spot de la lame de **RP** ou sur le spot de lame de l'échantillon patient fixé.
- Incubez les lames à 37°C en chambre humide pour 30 minutes. Ne laissez pas les lames sécher, car cela accroît le risque de marquages non spécifiques.
- Rincez les lames délicatement dans un bain de P.B.S. pendant 1 minute.
- Egouttez les lames afin d'éliminer tout liquide excessif jusqu'à ce qu'elles soient sèches.
- Déposez une goutte de **RMF** sur chaque spot. Placez la lamelle en évitant les bulles.
- Observez le spécimen au microscope à fluorescence sous huile à immersion, initialement à x400, puis à x1000 pour confirmation. Si l'observation est retardée, conservez les lames à l'obscurité à 2-8°C jusqu'à 24 heures.

OBSERVATION, INTERPRETATION DES RESULTATS ET DIAGNOSTIQUE

A l'inverse de la coloration de fond brun rougeâtre, les trophozoïtes pleomorphes de *Pneumocystis carinii* (PC) présentent une intense fluorescence vert pomme, alors que les cystes à paroi épaisse présentent une fluorescence en halo autour de leur périphérie. Les organismes peuvent être seuls ou plus fréquemment en grappes incluses dans une membrane extracellulaire, aussi colorée. Lorsque vous observez au moins deux cystes, le résultat est positif. Utilisez la lame de contrôle à titre de comparaison pour vérifier l'apparence et la taille des organismes. Le résultat est négatif quand aucun organisme fluorescent de morphologie caractéristique n'est observable. Ignorez tout élément fluorescent qui n'est pas vert pomme et qui se distingue de la forme typique de *P. carinii*.

DECHETS

Jetez tout composant inutilisé dans la poubelle aux déchets biologiques. Lorsque vous videz le réactif du coffret dans l'évier, assurez-vous dans le diluer avec une large quantité d'eau courante, car l'azide de sodium qu'il contient peut être explosif en contact avec les égouts en cuivre ou en plomb. Consultez la fiche de sécurité du produit (notice MSDS) pour plus amples informations.

SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ ET AUTRES DONNEES DU TEST PNEUMO CEL

Referrez-vous au tableau récapitulatif en fin de notice. Toutes les données sur le test Pneumo Cel sont sur la fiche technique du produit. Contactez Cellabs ou votre distributeur pour l'obtenir.

NOTICE D'INDEMNITE

Toute modification ou variation du protocole d'emploi recommandé peut affecter les performances annoncées du produit. Un résultat positif ou négatif n'exclue pas la présence d'autres agents causatifs sous-jacents. Cellabs et ses agents et distributeurs ne sont également responsables d'aucun dommage dans de telles circonstances.

PNEUMO CEL

UTILIZAÇÃO E PRINCIPIO DO TESTE

O teste Pneumo Cel IF é um teste rápido *in vitro* directo por imunofluorescência para a detecção de *Pneumocystis carinii* em amostras humanas. O reagente de anticorpo monoclonal de rato marcado com floresceína liga-se, especificamente, a *P. carinii* na amostra. Estes apresentam uma cor verde fluorescente com morfologia típica.

CONTEUDO DO KIT

| | | KP1 Demo | KP1 Standard | Bulk |
|------------|---|-----------|--------------|------------|
| RP1 | Reagente Pneumo Cel | 0,25mL | 1,25mL | 5mL |
| RP | Lâmina de controlo positivo (para uma utilização) | 1 | 1 | - |
| RMF | Meio de Montagem | 2,5mL | 2,5mL | - |
| | <i>Testes</i> | <i>10</i> | <i>50</i> | <i>200</i> |

Os materiais fornecidos estão prontos a usar. Conservar a 2-8°C. As datas de validade estão referidas em cada componente do kit e na caixa do mesmo. As datas de validade não se alteram com a abertura dos componentes.

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO É FORNECIDO

Lâminas de microscópio com poços de 6-8mm de diâmetro; pipeta de precisão para dispensar 25µL; acetona para fixar a amostra; câmara de humidade; recipiente de lavagem; tampão fosfato salino (PBS) para etapa de lavagem; lamelas; óleo de imersão não-fluorescente; microscópio de fluorescência com sistema de filtro para FITC (distância máxima de onda 490nm, emissão média 530nm) a 400X e 1000X de aumento.

PRECAUÇÕES

Apenas para diagnóstico *in vitro*. Não utilizar após ter passado a data de validade. Se a embalagem protectora for danificada, contactar o representante local e pedir a substituição por uma nova. Não misturar componentes de kits diferentes. O Reagente Pneumo Cel foi optimizado para a utilização com a lâmina de controlo positivo e o meio de montagem fornecidos pela Cellabs. O Evans Blue, presente no reagente, é um possível cancerígeno, e por isso deve ser evitado o contacto com a pele. As amostras de doentes e o slide controlo positivo devem ser manuseados como sendo potencialmente infecciosos. Em cada série de testes deve ser executada uma lâmina correspondente ao Controlo Positivo. Consultar a ficha de segurança do produto (MSDS) para mais informações.

COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras clínicas devem ser analisadas logo que possível após a sua colheita. A expectoração induzida, lavado brônquico, lavado bronco alveolar e esfregaço de tecido sobre a lâmina. A presença mucosidade na amostra poderá evitar uma coloração adequada. Trabalhar com uma máscara biológica de segurança. Uma lâmina de controlo positivo deve ser incluído com cada série de amostras testada.

Preparação de Amostras de Expectoração Induzida

Preparar 0.3% de DTT (*dithiothreitol*) em água destilada. Misturar volumes iguais de expectoração e de solução DTT. Agitar vigorosamente. (vortex) para eliminar grumos. Incubar durante 30 minutos a 37°C. Centrifugar durante 5 minutos a 1500g. Decantar o sobrenadante sobrenadante. Suspender em 0.2-0.5mL de PBS e misturar vigorosamente.

Preparação de Amostras de Lavado Brônquico e Lavado Bronco alveolar

Centrifugar a amostra a 1500g durante 10 minutos. Remover o sobrenadante deixando 0,5mL de sobrenadante decantado. Resuspender em 0,2-0,5mL de PBS misturando vigorosamente.

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Aplicar 25µL num poço de uma lâmina (0,8cm) e secar ao ar. Fixar a lâmina durante 5 minutos em acetona. Se as lâminas não forem coloradas de imediato podem ser conservadas abaixo dos 0°C por várias semanas.

INSTRUÇÕES DE USO

- Adicionar 25µL de **RP1** à amostra já fixada e a **RP** abrangendo bem toda a área.
- Incubar as lâminas a 37°C numa câmara de humidade durante 30 minutos. Não deixar que as lâminas sequem; isto pode causar ligações não-específicas.
- Passar suavemente por uma lavagem de PBS por um minuto.
- Enxagar e remover eventual humidade à volta do poço com papel absorvente.
- Adicionar uma gota de **RMF** ao poço da lâmina. Colocar a lamela sobre a gota retirando as bolhas de ar.
- Analisar toda a amostra com o auxílio de um microscópio de fluorescência, inicialmente com aumento 400X e posteriormente a 1000X para efeitos de confirmação. Ler de imediato ou conservar a 2-8°C no escuro num período máximo de 24 horas.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS E DO DIAGNÓSTICO

No contraste da cor vermelha acastanhada originada pelo material de contraste, os trofozoites pleomórficos do *Pneumocystis Carinii* (PC) adquirem uma intensidade fluorescência de verde maçã enquanto que os cistos com parede espessa parecem-se como uns corpos redondos corados no reborde com a aparência de um halo. Os organismos ocorrem sozinhos ou em grupos dentro da matriz extra celular, também esta colorada. Se forem observados dois ou mais oocistos o teste pode ser considerado positivo. Utilizar a lâmina de controlo positivo a título de comparação para verificar a aparência e o tamanho dos organismos PC. As amostras negativas não deverão apresentar organismos fluorescentes ou com a mesma morfologia. O material fluorescente que não for de cor verde clara que se destaquem da morfologia da PC não devem ser levados em consideração.

ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Deitar fora qualquer componente que tenha sido utilizado como material de risco biológico. Quando o reagente for despejado no lavatório verificar que isto é feito com quantidades abundantes de água. (este contém azida de sódio e pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo) Para mais informações consulte a MSDS.

SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, & OUTROS DADOS DO PNEUMO CEL

Consultar sumário no final do folheto de instruções. Todos os dados sobre o Pneumo Cel podem ser consultados na folha de informação do produto. Contacte o distribuidor ou contacte a Cellabs.

NOTA SOBRE POSSÍVEIS INDEMINIZAÇÕES

As modificações realizadas aparte do protocolo recomendado podem afectar os resultados. Um resultado positivo ou negativo não exclui a presença de outros agentes causadores subjacentes. A Cellabs e os seus distribuidores não serão legalmente responsáveis por qualquer dano nestas circunstâncias.

PNEUMO CEL

VERWENDUNGSZWECK UND TESTPRINZIP

Der Pneumo Cel IF Test ist ein schneller, direkter *in vitro* Immunfluoreszenztest zur Erkennung und Diagnose von *Pneumocystis carinii* in Patientenproben. Die Fluorescein-markierten monoklonalen Maus-Antikörper binden spezifisch an *Pneumocystis carinii* in der Probe. Die Organismen zeigen hellgrüne Fluoreszenz mit typischer Morphologie.

INHALT DES KITS

| | | KP1 Demo | KP1 Standard | Bulk |
|------------|---|-----------|--------------|------------|
| RP1 | Pneumo Cel Reagenz | 0,25ml | 1,25ml | 5ml |
| RP | Positiver Kontrollobjekträger (zum einmaligen Gebrauch) | 1 | 1 | - |
| RMF | Einbettungsmedium | 2,5ml | 2,5ml | - |
| | <i>Tests</i> | <i>10</i> | <i>50</i> | <i>200</i> |

Alle gelieferten Materialien sind gebrauchsfertig. Alle Komponenten sollten zwischen 2-8 °C gelagert werden. Das Verfalldatum ist auf jeder Kitkomponente und der Box deutlich gekennzeichnet. Die Verfalldaten ändern sich nicht nach dem Öffnen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE REAGENZIEN UND MATERIALIEN

Objekträger mit Testfeldern von 6-8 mm Durchmesser; Mikropipetten mit Einmalspitzen zum Pipettieren von 25µl; Azeton zur Fixierung der Proben; feuchte Kammer; Wasserbad; PBS zum Waschen; Deckgläser; nicht fluoreszierende Ölimmersion; Fluoreszenzmikroskop mit Filtersystem für FITC (maximale Exzitationswellenlänge 490 nm, mittlere Emissionswellenlänge 530nm) sowie 400- bis 1000-facher Vergrößerung.

VERKEHRUNGEN

Nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet. Reagenzien sollten nicht nach dem Verfalldatum benutzt werden. Reagenzien von verschiedenen Kits sollten nicht gemischt werden. Das Pneumo Cel Bulk-Reagenz wurde für den Gebrauch mit den positiven Kontrollen von Cellabs sowie dem mitgelieferten Einbettungsmedium optimiert. Evans Blau, das sich im IF-Reagenz befindet, ist ein mögliches Karzinogen, deshalb sollten Sie Kontakt mit der Haut meiden. Alle klinischen und Kontrollmaterialien sollten behandelt werden als wären sie potentiell infektiös und nach den jeweils laborüblichen Vorschriften entsorgt werden. Ein Positiver Kontrollobjekträger muss bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Weitere Informationen finden sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern zu den einzelnen Materialien.

PROBEGEWINNUNG

Klinische Proben sollten so frisch wie möglich verarbeitet werden. Induziertes Sputum, Material aus Bronchiallavage, bronchoalveoläre Lavagen und Abklatschpräparate können verwendet werden. Die Anwesenheit von mukösem Schleim in der Probe kann das adäquate Anfärben verhindern. Unter dem Abzug arbeiten! Eine positive Kontrolle sollte mit jedem Testansatz mitgeführt werden.

Vorbereitung von Proben aus induziertem Sputum

Eine Lösung von 0,3% Dithiothreitol (DTT) in destilliertem Wasser herstellen. Gleiches Volumen von Sputum und DTT-Lösung mischen. Stark schütteln, um Klumpen aufzulösen. 30 Minuten bei 37 °C inkubieren. 5 Minuten bei 1500g zentrifugieren. Überstand werfen. Das Pellet in 0,2-0,5ml PBS resuspendieren und kräftig schütteln.

Vorbereitung von Proben aus Bronchiallavage und bronchoalveolärer Lavage

Probe bei 1500g 10 Minuten zentrifugieren. Überstand werfen und 0,5ml übrig lassen. Das Pellet in 0,2-0,5ml PBS resuspendieren und kräftig schütteln.

VERBEREITUNG DER OBJEKTRÄGER

25µl der Probe auf das Testfeld (0,8cm) eines Objekträgers bringen. Die Probe trocknen lassen. 5 Minuten mit Azeton fixieren. Danach erneut trocknen. Falls die Probe nicht sofort gefärbt wird, unter 0 °C für einige Wochen lagern.

PNEUMO CEL GEBRAUCHSANLEITUNG

- 25µl **RP1** auf die fixierte Probe sowie den **RP** geben. Das gesamte Testfeld soll bedeckt sein. Reagenz nach dem Gebrauch sofort wieder bei 2-8 °C lagern.
- 30 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubieren. Die Objekträger dürfen nicht austrocknen, weil dies unspezifische Bindungen bewirken kann.
- Vorsichtig in einem Bad mit PBS eine (1) Minute lang spülen.
- Flüssigkeit vom Objekträger ablaufen lassen und verbliebene Feuchtigkeit rund um das Testfeld mit einem Tuch abtupfen.
- Einen Tropfen **RMF** auf das Objekträger-Testfeld geben. Ein Deckglas aufsetzen und Luftblasen entfernen.
- Die gesamte Probe im Fluoreszenzmikroskop mittels Ölimmersion bei anfänglich 400- bis 1000-facher Vergrößerung durchsehen. Sofort ablesen oder bei 2-8 °C (im Dunkeln) bis maximal 24 Stunden lagern.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE UND DIAGNOSESTELLUNG

Im Gegensatz zu der rötlich-braunen Farbe des gegengefärbten Materials weisen die pleomorphen Trophoziten von *Pneumocystis carinii* (PC) eine intensive, apfelgrüne Fluoreszenz auf, während die dickwandigen Zysten als runde Strukturen vorliegen, die am Rand halo-ähnlich angefärbt sind. Die Organismen treten entweder einzeln oder häufiger in Clustern in einer extrazellulären Matrix auf, die ebenfalls angefärbt ist. Ein Test kann als positiv beurteilt werden, wenn die fixierten Proben mindestens 2 Zysten enthalten. Die Organismen sind vor einem rötlich-braunen Hintergrund zu sehen. Die Kontrollen sollten zum Vergleich des Aussehens der Organismen, die in den Proben gefunden werden, herangezogen werden. Negative Proben sollten keine fluoreszierenden Organismen mit der charakteristischen Morphologie enthalten. Fluoreszierendes Material, das nicht apfelgrün ist und sich deutlich von der Morphologie unterscheidet, sollte nicht beachtet werden.

ENTSORGUNGSHINWEISE

Alle nicht benötigten Komponenten müssen als biogefährdender Abfall entsorgt werden. Wenn das Test-Reagenz in das Waschbecken geschüttet wurde, muß mit großen Mengen Wasser nachgespült werden, da das darin enthaltene Natriumazid mit Kupfer-/Bleiverbindungen des Rohrleitungssystems reagieren kann. Für mehr Informationen siehe die Sicherheitsdatenblätter.

SENSITIVITÄT, SPEZIFITÄT UND ANDERE DATEN ZUM PNEUMO CEL

Siehe zusammenfassende Tabelle am Ende dieser Anleitung. Alle Daten zum Pneumo Cel können aus der Produktinformation entnommen werden. Fragen Sie bitte Ihren lokalen Vertreter oder kontaktieren Sie Cellabs.

HAFTUNGSAUSSCHLUSS

Änderungen oder Modifikationen der empfohlenen Durchführung können die gemachten oder gefolgerten Angaben beeinflussen. Ein positives oder negatives Ergebnis schließt nicht andere zugrunde- liegende Krankheiten aus. Cellabs und seine Vertreter sind für Folgen derartiger Konstellation nicht haftbar.

PNEUMO CEL

IMPIEGO E PRINCIPIO DEL TEST

Pneumo Cel IF Test è un test rapido in immunofluorescenza diretta per la rilevazione di *Pneumocystis carinii* in campioni umani. Gli anticorpi monoclonali di topo, marcati con fluoresceina, si legano in modo specifico a *P. carinii*, presente nel campione. *P. carinii* appare con una morfologia tipica e colorato con una brillante fluorescenza verde.

CONTENUTO DEL KIT

| | RP1 | RP | RMF | | KP1 Demo 0.25mL | KP1 Standard 1.25mL | Bulk 5mL |
|--|---|----|-----|-----------------|--------------------|------------------------|-------------|
| | Reagente Pneumo Cel | | | | | | |
| | Vetrino di Controllo Positivo (solo ad uso singolo) | 1 | 1 | | 1 | 1 | - |
| | Mezzo di montaggio | | | | 2.5mL | 2.5mL | - |
| | | | | <i>Campioni</i> | <i>10</i> | <i>50</i> | <i>200</i> |

I materiali sono forniti pronti all'uso. Conservare a 2-8°C. Le date di scadenza sono chiaramente marcate su ogni componente del kit e sulla confezione. Le date di scadenza non cambiano una volta aperte le confezioni.

MATERIALE RICHiesto MA NON FORNITO

Vetrini per microscopio con pozzetti di diametro 6-8 mm; pipetta di precisione per distribuire 25µL; acetone per fissare il campione; camera umida; vaschetta di lavaggio; tampone fosfato salino (PBS) per il lavaggio; vetrini coprioggetto; olio per immersione non fluorescente; microscopio a fluorescenza con sistema di filtraggio FITC (lunghezza d'onda di eccitazione massima 490nm, lunghezza d'onda media 530nm) e ingrandimento 400x-1000x.

PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico *in vitro*. Non usare dopo la data di scadenza mostrata sull'etichetta. Se l'imballo protettivo è danneggiato, contattare il distributore di zona e chiedere una sostituzione. Non mischiare i componenti provenienti da kit diversi. Pneumo Cel Reagent è stato ottimizzato per l'impiego insieme al Vetrino di Controllo Positivo Cellabs e al Mezzo di Montaggio Cellabs. Il colorante Evans Blue contenuto nel reagente del test può essere cancerogeno, quindi evitare il contatto con la pelle. I campioni clinici e i vetrini di controllo positivo devono essere maneggiati come potenzialmente infetti. Si deve eseguire un Vetrino di Controllo Positivo con ogni test eseguito. Per maggiori informazioni consultare la scheda di sicurezza del prodotto (MSDS).

RACCOLTA DEI CAMPIONI

I campioni clinici devono essere processati appena possibile dopo il prelievo. Possono essere utilizzati l'espettorato indotto, il lavaggio bronchiale, il lavaggio bronchio-alveolare e lo striscio del tessuto per impressione. La presenza di muco nel campione può impedire la corretta colorazione del campione. Lavorare sotto cappa di sicurezza biologica. Si raccomanda di includere un vetrino di controllo positivo in ciascuna sessione di esame.

Preparazione dell'espettorato indotto

Preparare una soluzione di diotriteitolo (DTT) allo 0,3% in acqua distillata. Miscelare volumi eguali di espettorato e di soluzione DTT. Mescolare vigorosamente (Vortex) per eliminare i grumi. Incubare per 30 minuti a 37°C. Centrifugare per 5 minuti a 1500g. Decantare il soprannatante. Risospendere il pellet in 0,2-0,5mL di PBS e mescolare vigorosamente.

Preparazione dei campioni da lavaggio bronchiale e da lavaggio bronchioalveolare

Centrifugare a 1500g per 10 minuti. Rimuovere il soprannatante lasciando 0,5mL. Decantare il soprannatante. Risospendere il pellet in 0,2-0,5mL di PBS e mescolare vigorosamente.

PREPARAZIONE DEI VETRINI

Distribuire 25µL di campione su un pozzetto (0,8cm) del vetrino ed asciugare all'aria. Fissare il vetrino in acetone per 5 minuti. Se i vetrini non sono colorati immediatamente possono essere conservati a temperature inferiori a 0°C per diverse settimane.

ISTRUZIONI PER L'USO

1. Aggiungere 25µL di **RP1** allo striscio del campione fissato e **RP**, coprendo l'intera area del pozzetto.
2. Incubare i vetrini a 37°C in camera umida per 30 minuti. Non lasciare che i vetrini si asciughino onde evitare legami aspecifici.
3. Lavare delicatamente in una vaschetta con PBS per un minuto.
4. Drenare il vetrino e rimuovere l'eccesso di umidità intorno ai pozzetti con del tessuto.
5. Aggiungere una goccia **RMF** sul pozzetto del vetrino. Deporre un vetrino copri oggetto sulla goccia ed eliminare le bolle d'aria.
6. Esaminare l'intero campione usando un microscopio a fluorescenza in immersione ad olio inizialmente a 400x, quindi a 1000x d'ingrandimento, per la conferma. Leggere immediatamente o conservare a 2-8°C al buio fino a 24 ore.

LETTURA, INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E DIAGNOSI

In contrasto al colore bruno rossastro del materiale contro colorante, il trofozoite pleomorfico di *Pneumocystis carinii* (PC) esibisce una intensa fluorescenza verde mela, mentre le cisti a pareti spesse appaiono come corpi rotondi colorati nel bordo con aspetto simile ad un anello. I microrganismi si manifestano sia singolarmente ma più comunemente in gruppi all'interno della matrice extracellulare, che viene anch'essa colorata. Il test è considerato positivo se sono presenti due o più cisti. Il campione di controllo deve essere usato per il confronto delle dimensioni e dell'aspetto di PC. I campioni negativi non devono evidenziare microrganismi fluorescenti di morfologia caratteristica. Materiale fluorescente che non è di colore verde mela e che può essere distinto dalle forme tipiche di PC non deve essere preso in considerazione.

RACCOMANDAZIONI PER LO SMALTIMENTO

Eliminare qualsiasi componente non utilizzato come rifiuto potenzialmente infettivo. Quando il reagente viene eliminato nel lavello, assicurarsi che sia dilavato con grande quantità d'acqua (poiché la sodio azide contenuta può reagire con le tubature di rame o piombo). Per maggiori informazioni consultare la scheda di sicurezza (MSDS).

SENSIBILITA', SPECIFICITA' ED ALTRI DATI

vedere la tabella riassuntiva alla fine del foglio di istruzioni. Tutti i dati sulla Pneumo Cel sono disponibili sul foglio di istruzioni che è possibile richiedere al distributore di zona o contattando Cellabs.

AVVERTENZE SULL'INDENNIZZO

Modifiche o cambiamenti apportati alla procedura raccomandata possono modificare lo stato o causare reclami. A Un risultato positivo o negativo non preclude la presenza di altri importanti agenti eziologici. Cellabs ed i suoi distributori non saranno responsabili per i danni causati da questa eventualità.

PNEUMO CEL

APLICACIONES Y PRINCIPIO DEL TEST

El test Pneumo Cel IF es un ensayo *in vitro* por inmunofluorescencia directa para la detección de *Pneumocystis carinii* en muestras humanas. El anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con fluoresceína se une específicamente a los *P. carinii* presentes en la muestra. Los *P. carinii* muestran una fluorescencia verde brillante con una morfología típica.

CONTENIDO DEL KIT

| | RP1 | RP | RMF | | KP1 Demo 0.25mL | KP1 Estándar 1.25mL | Bulk 5mL |
|--|---------------------------------------|----|-----|--------------|--------------------|------------------------|-------------|
| | Reactivo de Pneumo Cel | | | | | | |
| | Porta control positivo (un único uso) | 1 | 1 | | 1 | 1 | - |
| | Medio de montaje | | | | 2.5mL | 2.5mL | - |
| | | | | <i>Tests</i> | <i>10</i> | <i>50</i> | <i>200</i> |

Los materiales suministrados están listos para su uso. Almacenar a 2-8°C. Las fechas de caducidad están indicadas específicamente en cada uno de los componentes del kit y en el envase externo del mismo. Las fechas de caducidad indicadas no cambian tras la apertura.

MATERIALES REQUERIDOS QUE NO SE PROPORCIONAN

Portas para microscopía con pocillos de 6-8mm de diámetro; pipeta de precisión para añadir 25µL; acetona para la fijación de la muestra; cámara húmeda, cubeta para lavado; tapón fosfato (PBS) para el paso de lavado; cubres; aceite de inmersión no fluorescente; y microscopio de fluorescencia con sistema de filtro para FITC (longitud de onda de excitación máxima 490nm, longitud de onda de emisión media 530nm) y x400-x1000 aumentos.

PRECAUCIONES

Para utilización exclusiva en el diagnóstico *in vitro*. No utilizar después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Si se observase que el envase exterior está dañado, contactar con su distribuidor local y solicitar un kit nuevo. No mezclar componentes de diferentes kits. El reactivo Pneumo Cel se ha optimizado para su uso con el porta control positivo y el medio de montaje de Cellabs. El colorante de contraste azul de Evans incluido en el reactivo del test es un posible carcinógeno, por lo que debe evitarse el contacto con la piel. Las muestras de los pacientes y el porta control positivo deberían manipularse como si se tratase de material potencialmente infeccioso. Debe incluirse un porta de control positivo en cada ensayo. Para más información al respecto, consultar la ficha de datos de seguridad (FDS).

RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Las muestras clínicas deben procesarse lo antes posible tras su recogida. Se pueden emplear esputos inducidos, lavado bronquial, lavado bronco-alveolar e impresoras de tejidos. La presencia de mucosa en la muestra puede impedir una tinción adecuada. Trabajar en campana de bioseguridad. Se debería de incluir un porta de control positivo con cada serie de muestras a ensayar.

Preparación de muestras de esputo inducido

Preparar diotriteitolo (DTT) al 0,3% en agua destilada. Mezclar volúmenes iguales de esputo y de la solución de DTT. Mezclar intensamente (con vortex) para deshacer los agregados. Incubar durante 30 minutos a 37°C. Centrifugar durante 5 minutos a 1500g. Decantar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 0,2-0,5mL de PBS y mezclar completamente.

Preparación de muestras de lavado bronquial y lavado broncoalveolar

Centrifugar la muestra a 1500g durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante dejando un volumen remanente de 0,5mL. Decantar el sobrenadante. Resuspender el precipitado en 0,2-0,5mL de PBS y mezclar completamente.

PREPARACIÓN DE LOS PORTAS

Aplicar 25µL de muestra a un pocillo del porta (0,8cm) y dejar secar al aire. Fijar el porta durante 5 minutos en acetona. Si no se va a proceder a la tinción inmediata de los portas, deberían almacenarse a temperatura inferior a 0°C, conservándose durante varias semanas.

ISTRUCCIONES DE USO

1. Añadir 25µL de **RP1** a la muestra fijada y **RP**, cubriendo el área del pocillo.
2. Incubar los portas a 37°C en una cámara húmeda durante 30 minutos. Evitar que los portas se sequen, ya que esto podría dar lugar a uniones inespecíficas.
3. Lavar con cuidado en un baño de PBS durante un minuto.
4. Escurrir el líquido del porta y eliminar el exceso de humedad alrededor del pocillo con papel secante.
5. Añadir una gota de **RMF** al pocillo del porta. Colocar un cubre sobre la gota y eliminar las burbujas.
6. Leer la muestra completa usando un microscopio de fluorescencia, inicialmente a X400 aumentos, y posteriormente a X1000 para confirmar. Leer inmediatamente o almacenar a 2-8°C en oscuridad hasta un máximo de 24 horas.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y DIAGNÓSTICO

En contraste con el color marrón-rojizo de la tinción de contraste, los trofozoitos pleomorficos de *Pneumocistis carinii* (PC) muestran una fluorescencia de color verde manzana intenso, mientras que los quistes de pared gruesa se muestran como cuerpos redondeados teñidos en la periferia con "aparencia similar a un halo". Los organismos se presentan aisladamente o bien, de forma más común, agrupados dentro de la matriz extracelular, que también queda teñida. El test se considera positivo si están presentes dos o más quistes. La muestra de control debe usarse para comparar con la apariencia y tamaño de los organismos PC. Las muestras negativas no deberían mostrar organismos fluorescentes de morfología característica. No debe tenerse en cuenta ningún material fluorescente que no sea de color verde manzana y pueda distinguirse de las formas típicas de PC.

ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS

Los componentes sin usar deben eliminarse como material de riesgo biológico. Si el reactivo del test se elimina por el sistema de desagüe, asegurarse de enjuagarlo con abundante agua corriente (la azida sódica que contiene puede reaccionar con las conducciones de cobre o plomo). Para más información, consultar la ficha de datos de seguridad FDS.

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, Y OTROS DATOS DEL PNEUMO CEL

Consultar la tabla con el esquema del protocolo al final de este manual. Todos los datos sobre el ensayo de Pneumo Cel se pueden obtener en la ficha técnica del producto. Para más información, preguntar a su distribuidor local o contactar con Cellabs.

INFORMACIÓN SOBRE POSIBLES INDEMNIZACIONES

Las modificaciones o cambios realizados sobre el procedimiento recomendado pueden afectar a las posibles reclamaciones tanto directa como indirectamente. Un resultado positivo o negativo no excluye la presencia de otros agentes etiológicos subyacentes. Ni Cellabs ni sus agentes o distribuidores serán legalmente responsables por daños producidos bajo estas circunstancias.