



CRYPTO CEL

FIGURE 1: CRYPTO CEL DIAGRAM FOR USE

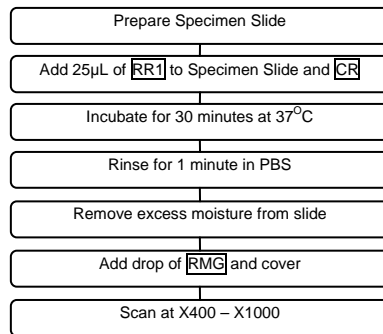


TABLE 1: SENSITIVITY, SPECIFICITY, & OTHER DATA ON THE CRYPTO CEL

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

| Trial Essai Versuch Prova Prueba Teste | Sensitivity Sensibilité Sensitivität Sensibilita' Sensibilidad Sensibilidade | Specificity Spécificité Spezifität Spezifitita' Especificidad Especificidade | Repeatability Répétabilité Wiederholpräzision Ripetibilita Repetibilidad Repetição | Reproducibility Reproductibilité Reproduzierbarkeit Riproducibilita Reproducibilidad Reprodutibilidade |
|--|---|---|---|---|
| A | 100% | 100% | - | - |
| B | - | - | 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 reacções cruzadas com: <i>Eimeria tenella, Toxoplasma gondii, Giardia lamblia, Trichomonas hominis, Isospora belli, Microsporidium sp., Pneumocystis carinii, Candida sp., Aspergillus sp., Listeria sp., Legionella sp., Erysipelothrix sp., Escherichia sp., Lactobacillus sp., Streptococcus sp., Staphylococcus sp., Bacillus sp., Clostridium sp., Brochothrix sp., Corynebacterium sp.</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 Diagnostic Médical In Vitro
 In-vitro-Diagnostika
 Diagnostico in vitro Dispositivo medico
 Producto Sanitario para Diagnóstico In Vitro
 Produto de Diagnóstico Médico 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
 Hersteller
 Fabbriicante
 Fabricante
 Fabricante



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

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

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



LR1.11 - PDF
 28th November 2006

INTENDED USE AND PRINCIPLE OF THE TEST

The Crypto Cel IF Test is an in vitro direct immunofluorescence test for the detection of *Cryptosporidium* in faecal and environmental specimens. The fluorescein-labelled mouse monoclonal antibody reagent binds specifically to *Cryptosporidium* in the specimen. *Cryptosporidium* display bright green fluorescence with typical morphology.

CONTENTS OF THE KIT

| | RR1 | CR | RMG | RR1 Demo | RR1 Standard | Bulk |
|-------|--------------------|--|----------------|----------|--------------|------|
| | Crypto Cel Reagent | Positive Control Slide (Single Use only) | Mounting Fluid | 0.25mL | 1.25mL | 5mL |
| | | | | 1 | 1 | - |
| | | | | 2.5mL | 2.5mL | - |
| Tests | | | | 10 | 50 | 200 |

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; methanol 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 components from different kits. The Crypto 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. The detection of *Cryptosporidium* from water is dependent on the efficient filtration and recovery from large volumes of water (500-1000L). A Positive Control Slide must be run with each test run. Refer to Material Safety Data Sheet (MSDS) for further information.

SPECIMEN PREPARATION

Stool specimens, either fresh or preserved in 10% formalin or SAF may be used (Specimens treated with other fixatives have not been tested). A procedure for processing fresh stool specimens is described below. If stool specimens are not processed immediately they may be stored at 2-8°C for 24-48 hours. Stools may be concentrated prior to processing using concentration kits. They may also be concentrated by the formalin-ether sedimentation method.

Prepare an approximate 1/10-1/50 dilution of stool. Dilute 50µL or 5mm diameter of stool in PBS with 0.1% sodium azide and mix thoroughly to disperse the specimen using an applicator stick and allow large stool particles to sediment.

PREPARATION OF SLIDES

- Place 20µL of the faecal or concentrated specimen from water onto a microscope slide.
- Allow the specimen to completely air dry.
- Fix the slides for 5 minutes in methanol and allow to air dry.

INSTRUCTIONS FOR USE

- Add 25µL of RR1 to the fixed specimen and CR 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 RMG 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

Cryptosporidium oocysts are 2-6µm in size, round or oval in shape with bright green fluorescence. A fold or suture can be seen on the surface. This suture is less apparent in environmental samples. The test may be considered positive if one or more oocysts are present. The positive control slide should be used for comparison with the appearance and size of the oocysts. Negative specimens should have signs of faecal material containing debris such as undigested food particles, cells (counterstained red-brown), and possibly other organisms such as bacteria and protozoa, and should not show any organisms of characteristic green fluorescence and morphology. Non-specific fluorescence may occur in some specimens but this may be distinguished morphologically from the oocysts. When less than 5 oocysts are seen the test should be repeated with a lower dilution of specimen and subsequent specimens should also be tested. Algae may be present in environmental specimens and these fluoresce red-orange.

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 CRYPTO CEL

Refer to summary table at end of insert. All data on the Crypto 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.

CRYPTO CEL

PRINCIPE DU TEST ET INDICATIONS D'EMPLOI

Le coffret Crypto Cel IF est un test *in vitro* par immunofluorescence directe conçu pour détecter et diagnostiquer la présence d'oocystes de *Cryptosporidium* dans les échantillons de l'environnement ou de matière fécale. L'anticorps monoclonal de souris marqué à la fluorescéine se lie spécifiquement aux oocystes de *Cryptosporidium* de l'échantillon. Les *Cryptosporidium* fluorescent d'un vert intense et démontrent leur morphologie typique.

COMPOSITION DU COFFRET

| | | KR1 Demo | KR1 Standard | Bulk |
|------------|--|-----------|--------------|------------|
| RR1 | Réactif Crypto Cel | 0.25mL | 1.25mL | 5mL |
| CR | Contrôle Positif sur lame (réactif à usage unique) | 1 | 1 | - |
| RMG | 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; méthanol 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. Crypto 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. La détection de *Cryptosporidium* dans les échantillons d'eau dépend de l'efficacité de la filtration et de la récupération du parasite à partir de larges volumes d'eau (500-1000L). 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.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

On peut utiliser des échantillons fécaux frais ou conservés au formol à 10% ou au préservatif S.A.F. La préparation des échantillons frais est décrite ci-après. Si les échantillons ne sont pas analysés immédiatement, on peut les conserver à 2-8°C pendant 24-48 heures. Les échantillons fécaux peuvent être concentrés avant l'analyse, à l'aide d'un kit de concentration. Ils peuvent également être concentrés par sédimentation formol-ether.

Préparer une dilution approximative au 1/10-1/50 de l'échantillon fécal. Diluer 50 µl ou 5 mm de diamètre de fèces dans du tampon PBS avec 0.1% d'azide de sodium, et mélanger vigoureusement afin de disperser l'échantillon à l'aide d'une tige d'agitation, puis laisser les particules fécales sédimenter.

PREPARATION DES LAMES

1. Placer 20 µl de spécimen fécal ou d'échantillon d'eau concentré sur une lame microscopique.
2. Laisser sécher à l'air.
3. Fixer la lame à l'acétone pendant 5 minutes et laisser sécher à l'air.

MODE D'EMPLOI

1. Déposez 25 µL de **RR1** sur le spot de la lame de **CR** ou sur le spot de lame de l'échantillon patient fixé.
2. 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.
3. Rincez les lames délicatement dans un bain de P.B.S. pendant 1 minute.
4. Egouttez les lames afin d'éliminer tout liquide excessif jusqu'à ce qu'elles soient sèches.
5. Déposez une goutte de **RMG** sur chaque spot. Placez la lamelle en évitant les bulles.
6. 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

Les oocystes de *Cryptosporidium* font 2-6 µm, sont de forme ronde ou ovale et apparaissent vert pomme brillant. Un repli ou suture est visible sur leur surface. Cette suture est moins nette dans les échantillons environnementaux. Lorsque vous observez au moins 1 oocyste, le résultat est positif. Utilisez la lame de contrôle à titre de comparaison pour vérifier l'apparence et la taille des organismes. Dans un échantillon négatif on doit pouvoir voir de la matière fécale contenant des débris tels que des particules alimentaires non digérées, des cellules (colorées marron/rouge) et peut-être d'autres organismes tels que bactéries ou protozoaires, mais pas d'organisme fluorescent de taille ou de forme typique des *Giardia*. On peut parfois observer des fluorescences non spécifiques; mais elles peuvent généralement se distinguer morphologiquement des oocystes. Lorsqu'on observe moins de 5 oocystes, il faut répéter le test à une plus faible dilution de l'échantillon ainsi que des prélèvements successifs. Des algues qui fluorescent rouge/orange peuvent apparaître dans les échantillons environnementaux

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 CRYPTO CEL

Reférez-vous au tableau récapitulatif en fin de notice. Toutes les données sur le test Crypto 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.

CRYPTO CEL

UTILIZAÇÃO E PRINCIPIO DO TESTE

O teste Crypto Cel IF é um teste *in vitro* directo por imunofluorescência para a detecção de *Cryptosporidium* em amostras fecais e ambientais. O reagente de anticorpo monoclonal de rato marcado com fluoresceína liga-se, especificamente, a *Cryptosporidium* na amostra. Estes apresentam uma cor verde fluorescente com morfologia típica.

CONTEUDO DO KIT

| | KR1 Demo | KR1 Standard | Bulk |
|---|-----------|--------------|------------|
| RR1 Reagente Crypto Cel | 0.25mL | 1.25mL | 5mL |
| CR Lâmina de controlo positivo (para uma utilização) | 1 | 1 | - |
| RMG 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; metanol 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 Crypto Cel foi otimizado 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. A detecção de *Cryptosporidium* em água depende da filtração e da recuperação do parasita a partir de grandes volumes de água (500-1000L). 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.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Podem ser utilizadas amostras fecais, frescas ou conservadas em 10% de formalina ou em SAF. (amostras tratadas com outros fixadores ainda não foram testadas) O procedimento para amostras fecais frescas é descrito em baixo. Se não forem analisadas imediatamente, as amostras podem ser conservadas a 2-8°C durante 24 a 48 horas. As amostras podem ser conservadas antes utilização com o auxílio de kits específicos para esse efeito. Podem também ser conservados segundo o método de sedimentação com formalina-éter.

Preparar uma diluição aproximada de 1/10-1/50 da amostra. Diluir 50 µL ou 5mm de diâmetro da amostra fecal em PBS com 0.1% de azida de sódio e misturar bem para que a amostra se disperse utilizando um bastão de aplicação deixando que as partículas fecais sedimentem.

PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

- Colocar 20µL de amostra fecal ou amostra concentrada proveniente de água numa lâmina microscópica.
- Deixar a amostra secar ao ar completamente.
- Fixar as lâminas durante 5 minutos em metanol e deixar secar ao ar.

INSTRUÇÕES DE USO

- Adicionar 25µL de **RR1** à amostra já fixada e a **CR**, 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 **RMG** 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

Os oocistos de *Cryptosporidium* medem 2-6µm, de forma redonda ou oval com fluorescência verde clara. Na superfície, pode observar-se uma dobra ou sutura. Esta é menos aparente em amostras ambientais. Se for observado, no mínimo, um oocisto 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. As amostras negativas devem ter sinais de matéria fecal contendo vestígios tais como partículas de comida não digeridas, células (com coloração de contraste castanha-avermelhada), e possivelmente, de outros organismos tais como bactérias e protozoários e não deverá apresentar nenhum organismo de característica verde fluorescente ou morfologia semelhante à dos oocistos. Por vezes, podem ser observadas fluorescências não específica mas estas, geralmente, podem ser distinguidas dos oocistos. Quando se pode observar menos de 5 oocistos, o teste deverá ser repetido com uma diluição da amostra mais baixa. Podem surgir algas nas amostras ambientais e estas surgem com uma cor vermelha-laranja fluorescente.

ELIMINAÇÃO DOS RESÍDUOS

Deitar fora qualquer componente que tenha sido utilizado como material de risco biológico. Quando o reagente for despejado no lavatório verifique 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 CRYPTO CEL

Consultar sumário no final do folheto de instruções. Todos os dados sobre o Crypto 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

6/8

CRYPTO CEL

VERWENDUNGSZWECK UND TESTPRINZIP

Der Crypto Cel IF Test ist ein direkter *in vitro* Immunfluoreszenztest zur Erkennung und Diagnose von Kryptosporidien-Oozysten im Stuhl von Patienten und in Umweltproben. Die Fluorescein-markierten monoklonalen Maus-Antikörper binden spezifisch an Kryptosporidien-Oozysten in der Probe. Die Organsimen zeigen hellgrüne Fluoreszenz mit typischer Morphologie.

INHALT DES KITS

| | KR1 Demo | KR1 Standard | Bulk |
|---|-----------|--------------|------------|
| RR1 Crypto Cel-Reagenz | 0.25ml | 1.25ml | 5ml |
| CR Positiver Kontrollobjekträger (zum einmaligen Gebrauch) | 1 | 1 | - |
| RMG 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; Methanol 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.

VORKEHRUNGEN

Nur für die *in vitro*-Diagnostik geeignet. Reagenzien sollten nicht nach dem Verfalldatum benutzt werden. Reagenzien von verschiedenen Kits sollten nicht gemischt werden. Das Crypto 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. Die Identifikation von Kryptosporidien in Wasser ist abhängig von einer effizienten Filtration und Gewinnung aus entsprechend großem Volumen (500-1000 l). Ein Positiver Kontrollobjekträger muss bei jedem Testlauf mitgeführt werden. Weitere Informationen finden Sie in den jeweiligen Sicherheitsdatenblättern zu den einzelnen Materialien.

PROBENGEWINNUNG

Stuhlproben können entweder frisch oder in 10% Formalin oder SAF konserviert verwendet werden. (Proben, die mit anderen Fixierungsmethoden behandelt wurden, wurden nicht untersucht.) Die Handhabung frischer Stuhlproben ist unten beschrieben. Falls Stuhlproben nicht sofort untersucht werden, können sie bei 2-8 °C für 24-48 h gelagert werden. Stuhl kann vor dem Verarbeiten mittels Konzentrations-Kits konzentriert werden. Er kann auch mit der Formalin-Äther-Sedimentationsmethode konzentriert werden.

Bereiten Sie eine 1/10- bis 1/50-Verdünnung der Stuhlprobe vor. Verdünnen Sie 50µl oder 5mm Stuhldurchmesser in PBS mit 0,1% Natriumazid und mischen dies gründlich mittels eines Stäbchens, um die Probe zu verteilen. Große Stuhlpartikel absetzen lassen.

VORBEREITUNG DER OBJEKTRÄGER

- 20µl der Stuhlprobe oder des aus Wasser konzentrierten Materials auf ein Testfeld eines Objekträgers bringen.
- Die Probe trocknen lassen.
- 5 Minuten mit Methanol fixieren. Danach erneut trocknen.

CRYPTO CEL GEBRAUCHSANLEITUNG

- 25µl **RR1** auf die fixierte Probe sowie den **CR** 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 **RMG** 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

Kryptosporidien-Oozysten sind 2-6 µm groß, rund oder oval und hellgrün fluoreszierend. Eine Falte oder ein Einschnitt auf der Oberfläche kann beobachtet werden. Diese Kerbe ist weniger auffallend in Umweltproben. Ein Test kann als positiv angesehen werden, wenn die fixierten Proben mindestens 1 Oozyste enthalten. Die Organismen sind vor einem rötlich braunen Hintergrund zu sehen. Die Kontrollen sollten zum Vergleich des Aussehens der Organismen, die in der Proben gefunden werden, herangezogen werden. Negative Proben sollten Zeichen von fäkalem Material, wie Debris und nicht verdaute Speisereste, Zellen (gegengefärbtes rotbraunes Material) und möglicherweise andere Organismen, wie Bakterien und Protozoen, aufweisen, sollten aber keine Organismen mit charakteristischer grüner Fluoreszenz und Morphologie beinhalten. Unspezifische Fluoreszenz kann in einigen Fällen auftreten. Diese kann jedoch morphologisch von Kryptosporidien-Oozysten unterschieden werden. Algen können in Umweltproben vorkommen und fluoreszieren rot-orange.

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 CRYPTO CEL

Siehe zusammenfassende Tabelle am Ende dieser Anleitung. Alle Daten zum Crypto 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.

3/8

CRYPTO CEL

IMPIEGO E PRINCIPIO DEL TEST

Il test Crypto Cel IF è un test di immunofluorescenza diretta *in vitro* per la rilevazione della fluorescenza del *Cryptosporidium* in campioni fecali e ambientali. Il coniugato costituito da anticorpi monoclonali di topo marcati con fluoresceina si lega specificatamente al *Cryptosporidium* presente nel campione. *Cryptosporidium* emette una brillante fluorescenza verde con tipica morfologia.

CONTENUTO DEL KIT

| | | KR1 Demo 0.25mL | KR1 Standard 1.25mL | Bulk 5mL |
|------------|---|--------------------|------------------------|-------------|
| RR1 | Reagente Crypto Cel | | | |
| CR | Vetrino di Controllo Positivo (solo ad uso singolo) | 1 | 1 | - |
| RMG | 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, metanolo 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 utilizzare dopo la data di scadenza riportata sull'etichetta. Se la confezione fosse danneggiata, contattare il vostro distributore locale per una sostituzione. Non mischiare componenti di kit diversi. Il reagente Crypto Cel è stato ottimizzato solo per l'uso con vetrini di controllo positivo e mezzo di montaggio Cellabs. Il colorante Blu di Evan contenuto tra i reagenti è un possibile cancerogeno, pertanto evitare il contatto con la pelle. I campioni dei pazienti ed il vetrino di controllo positivo dovrebbero essere maneggiati come materiale potenzialmente infetto. La rilevazione del *Cryptosporidium* nelle acque dipende da una efficiente filtrazione e dal recupero di un elevato volume di acqua (500-1000L). Si deve eseguire un Vetrino di Controllo Positivo con ogni test eseguito. Riferirsi alla scheda di sicurezza (MSDS) per ulteriori informazioni.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Possono essere usati campioni di feci fresche o conservati in formalina al 10% o SAF (Campioni trattati con altri fissativi non possono essere utilizzati). La procedura per il trattamento di campioni di feci fresche è descritta di seguito. Se i campioni di feci non sono analizzati immediatamente devono essere conservati a 2-8°C per 24-48 ore. Le feci possono essere concentrate prima di essere processate usando un kit adatto. Potrebbero essere concentrate anche utilizzando il metodo di sedimentazione attraverso etere-formalina.

Per le feci preparare una diluizione 1/10-1/50. Diluire 50µL o di un campione di feci del diametro di circa 5mm in PBS con sodio azide 0.1% e miscelare attentamente per disperdere il campione utilizzando un bastoncino di applicazione e permettere a grosse particelle di feci di sedimentare.

PREPARAZIONE DEI VETRINI

1. Dispensare 20µL di campione fecale o campione concentrato proveniente dall'acqua su di un vetrino da microscopio.
2. Consentire la completa essiccazione all'aria del campione.
3. Fissare il vetrino in metanolo per 5 minuti e permettere l'essiccazione all'aria.

ISTRUZIONI PER L'USO

1. Aggiungere 25µL di **RR1** al campione fissato ed al controllo positivo **CR**, coprendo la zona dei pozzetti.
2. Incubare i vetrini a 37°C in camera umida per 30 minuti. Non permettere ai vetrini di seccare perché si potrebbero verificare legami aspecifici.
3. Lavare delicatamente in una vaschetta con PBS per un minuto.
4. Asciugare il vetrino e rimuovere l'eccesso di umidità attorno al pozzetto con carta assorbente.
5. Aggiungere una goccia di **RMG** sul pozzetto del vetrino. Posizionare un coprioggetto sulla goccia ed eliminare le eventuali bolle d'aria.
6. Analizzare l'intero campione con un microscopio a fluorescenza iniziando con un ingrandimento 400x, e successivamente con un ingrandimento 1000x per conferma. Leggere immediatamente o conservare a 2-8°C al buio per non più di 24 ore.

LETTURA, INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E DIAGNOSI

Le oocisti di *Cryptosporidium* hanno una misura di 2-6µm, di forma rotonda od ovale con una brillante fluorescenza verde. Sulla superficie si può osservare una piega o una sutura. Questa sutura è meno evidente nei campioni ambientali. Questo test può essere considerato positivo se sono presenti uno o più oocisti. Il vetrino del controllo positivo dovrebbe essere utilizzato per confrontare morfologia e misura delle oocisti presenti nel campione. I campioni negativi potrebbero indicare la presenza nel materiale fecale di detriti come particelle alimentari non digerite, cellule (con colorazione di contrasto rosso-marrone), e possibili altri organismi quali batteri e protozoi, e non devono contenere alcun organismo caratterizzato da fluorescenza verde e morfologia simile alle oocisti. Una fluorescenza aspecifica potrebbe evidenziarsi in alcuni campioni che dovrebbero potersi distinguere dalle oocisti da un punto di vista morfologico. Quando sul vetrino sono visibili meno di 5 oocisti, il test dovrebbe essere ripetuto su di un nuovo campione sottoposto ad una diluizione inferiore alla precedente. Nei campioni ambientali potrebbero essere presenti delle alghe che si evidenziano con una fluorescenza rosso-arancio.

SMALTIMENTO DEI RIFIUTI

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 DI CRYPTO CEL

Vedere la tabella riassuntiva alla fine del foglio di istruzioni. Tutti i dati su Crypto 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. Un risultato positivo o negativo non esclude la presenza di altri importanti agenti eziologici. Cellabs ed i suoi distributori non sono legalmente responsabili dei danni nel caso di tali circostanze.

CRYPTO CEL

APLICACIONES Y PRINCIPIO DEL TEST

El test Crypto Cel IF es un ensayo *in vitro* por inmunofluorescencia directa para la detección de *Cryptosporidium* en muestras fecales y medioambientales. El anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con fluoresceína se une específicamente a los organismos de *Cryptosporidium* presentes en la muestra. Los *Cryptosporidium* muestran una fluorescencia verde brillante con una morfología típica.

CONTENIDO DEL KIT

| | | KR1 Demo 0.25mL | KR1 Estándar 1.25mL | Bulk 5mL |
|------------|---------------------------------------|--------------------|------------------------|-------------|
| RR1 | Reactivo de Crypto Cel | | | |
| CR | Porta control positivo (un único uso) | 1 | 1 | - |
| RMG | 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; metanol 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 Crypto 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. La detección de *Cryptosporidium* en agua depende de una filtración y recuperación eficientes a partir de grandes cantidades de agua (500-1000L). Debe incluirse un porta de control positivo en cada ensayo. Para más información al respecto, consultar la ficha de datos de seguridad (FDS).

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Pueden emplearse muestras fecales, recientes o conservadas con formalina al 10% o SAF (No se han ensayado muestras tratadas con otros fijadores). A continuación se describe un protocolo para el procesamiento de muestras fecales frescas. Si la muestra fecal no va a testarse de inmediato, puede almacenarse a 2-8°C durante 24-48 horas. Las muestras fecales se pueden concentrar antes de su empleo usando kits de concentración. También se pueden concentrar por el método de sedimentación con formalina-éter.

Preparar una dilución aproximada de 1/10-1/50 de muestra fecal. Diluir 50µL o 5mm de diámetro de heces en PBS con azida sódica al 0.1% y mezclar bien para dispersar la muestra con ayuda de una varilla aplicadora, permitiendo que sedimenten las partículas de mayor tamaño.

PREPARACIÓN DE LOS PORTAS

1. Colocar 20µL de la muestra fecal o de concentrado procedente del agua sobre un porta.
2. Dejar secar la muestra al aire completamente.
3. Fijar los portas durante cinco minutos en metanol y dejar secar al aire.

INSTRUCCIONES DE USO

1. Añadir 25µL de **RR1** a la muestra fijada y **CR**, 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 **RMG** 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

Los oocitos de *Cryptosporidium* tienen un tamaño de 2-6µm, una forma redonda u ovalada y una fluorescencia verde brillante. Se aprecia un pliegue o sutura en su superficie, que resulta menos evidente en las muestras medioambientales. El test puede considerarse positivo si aparecen uno o más oocitos. El porta control positivo debe usarse para comparar el aspecto y el tamaño de los oocitos. Las muestras negativas pueden presentar trazas de partículas fecales que contengan residuos tales como partículas de alimentos sin digerir, células (teñidas con colorante de contraste marrón rojizo), y posiblemente otros organismos, tales como bacterias y protozoos, y no deberían mostrar ningún organismo de fluorescencia verde y morfología característica. En algunas muestras podría aparecer fluorescencia inespecífica, pero puede distinguirse de los oocitos por su morfología. Cuando se detecten menos de 5 oocitos debe repetirse el test con una muestra menos diluida, y las muestras siguientes deben testarse también. En las muestras medioambientales pueden aparecer algas, que presentan una fluorescencia rojiza-anaranjada.

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 CRYPTO CEL

Consultar la tabla con el esquema del protocolo al final de este manual. Todos los datos sobre el ensayo de Crypto 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.