

An Indirect Immunofluorescence Test for the Detection of P. carinii in Human Clinical Specimens / Test d'immunofluorescence indirecte pour la détection de P. carinii dans les échantillons cliniques humains / Prueba indirecta de inmunofluorescencia para la detección de P. carinii en muestras clínicas humanas / Indirekter Immunofluoreszenztest (IFFT) zur Bestimmung von P. carinii in Humanproben / Test di immunofluorescenza indiretta per la rivelazione di P. carinii in campioni clinici umani / Teste de imunofluorescência Indirecta para Detecção de P. carinii em Amostras Clínicas de Origem Humana / En indirekte immunofluorescens test for opdagelse af P. carinii i kliniske humanprøver / En indirekt immunofluorescenstest för detektion av P. carinii i humana kliniska prov / Μια εξέταση έμμεσου ανοσοφορισμού για την ανίχνευση της P. carinii σε ανθρώπινα κλινικά δείγματα

FOR PROFESSIONAL USE ONLY
USAGE RESERVE AUX PROFESSIONNELS
PARA USO PROFESIONAL ÚNICAMENTE
AUSSCHLIESSLICH FÜR BERUFLICHE ZWECKE
SOLO PER USO PROFESSIONALE
EXCLUSIVAMENTE PARA USO PROFESIONAL
KUN TIL FAGLIGT BRUG
ENDAST FÖR PROFESSIONELL ANVÄNDNING
ΓΙΑ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΝΟ

Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

Tel: +44 (0) 1382 422000, Fax: +44 (0) 1382 422088.

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Website: www.axis-shield.com

ENGLISH

INTENDED USE

The Detect IF *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) test is an indirect qualitative immunofluorescence kit for the detection of *P. carinii* oocysts in human bronchoalveolar lavage fluid and induced sputum. It is intended to aid in the diagnosis of suspected *P. carinii* infection. Results should be interpreted in light of all clinical and diagnostic information.

INTRODUCTION

Pneumocystis carinii is a eukaryotic microorganism of uncertain taxonomy. Recent ribosomal RNA homology studies have shown identical nucleic acid sequences with some fungi, but classification of the organism is still the subject of discussion.¹

P. carinii is ubiquitous, infecting man and other mammals; the route of infection is presumed to be airborne.¹ It is a major pathogen in the immunocompromised, especially patients with AIDS^{2,3} where it is an established cause of pulmonary infection. Starvation, haematological malignancies, collagen vascular diseases, primary cellular immune deficiency and immunosuppressive therapy, for example in transplant patients and leukaemic patients on cytotoxic drugs are factors that increase the likelihood of infection with *P. carinii* pneumonia.




Onset of *P. carinii* pneumonia may be apparently rapid or occur insidiously. When clinically evident, features are increased respiration rate and spiking fever. Chest films show a diffuse infiltrate; pulmonary function tests show alveolar-capillary block resulting from impaired gas exchange in alveoli, causing hypoxaemia and hypercapnia.

Currently, *P. carinii* pneumonia may be diagnosed by the observation of *P. carinii* in either open lung or transbronchial lung biopsy material, bronchoalveolar lavage^{4,5} or induced sputum. It can be visualised with a variety of non-specific stains including Gomori methenamine silver, toluidine blue-O, Gram-Weigert, Giemsa and Wright-Giemsa. Because all these stains react with yeasts and other structures, *P. carinii* must be distinguished on the basis of morphology. Staining techniques are time consuming and often require a high level of technical expertise in the interpretation of results. Monoclonal antibodies specific for *P. carinii* oocysts have become available, allowing the development of immunofluorescent techniques to rapidly and unambiguously identify *P. carinii* oocysts in bronchoalveolar material^{6,7} and induced sputum.^{8,9} The Detect IF *P. carinii* test uses a murine monoclonal antibody reactive with both human and rodent *P. carinii* in a simple and rapid test for the detection and identification of *P. carinii* in human bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and induced sputum (IS).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Bronchoalveolar lavage fluid or pre-treated induced sputum specimens are centrifuged and washed. The pellets are resuspended, placed on slides and fixed. The specimens are Enzyme-digested. Murine anti-*P. carinii* antibody and fluorescently labelled anti-mouse antibody are added in turn after incubation, rinsing, wicking, and air-drying steps. On viewing with a fluorescence microscope, oocysts show as medium bright to bright apple green and may be evenly or unevenly labelled. The presence of *P. carinii* oocysts in bronchoalveolar lavage fluid or induced sputum indicates *P. carinii* infection.

KIT COMPONENTS

REAG A	Anti- <i>P. carinii</i> Monoclonal Antibody	1 × 1 mL	Murine anti- <i>P. carinii</i> monoclonal antibody, bovine serum albumin, 0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	Xn 
REAG B	FITC-Conjugated Anti-Mouse Antibody	1 × 1 mL	Fluorescein-isothiocyanate (FITC) conjugated anti-mouse antibody, Evans Blue counterstain. Ready-to-use.	
REAG C	Enzyme (Lyophilised)	1 vial	Pre-treatment enzyme for clinical specimens. Reconstitute with 200 µL 0.001M HCl (supplied) and dilute before use.	Xn 
REAG D	Dilute Hydrochloric Acid (0.001M HCl)	1 × 0.5 mL	For Enzyme reconstitution. Ready-to-use.	
REAG E	Enzyme Diluent	1 × 3 mL	Tris buffer with enzyme activator. Ready-to-use.	
SPCM SLD	Patient Specimen Slides	25 slides	PTFE-coated (yellow) slides with four square specimen wells.	
REAG F	Mounting Medium	2 × 3 mL	Phosphate-buffered glycerol, Citifluor photobleaching retardant. Ready-to-use.	

STORAGE OF REAGENTS

Handling and Procedural Notes

1. Store kit components at 2-8°C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different kits.
3. Do not freeze kits.
4. The lyophilised Enzyme must be reconstituted before use, see Preparation for the Assay section. All other reagents are ready-to-use.
5. After reconstitution with 200 µL 0.001M HCl, the lyophilised Enzyme is stable for up to 3 months from the date of reconstitution if stored at 2-8°C .
6. Do not expose Mounting Medium to direct light during storage. Store at 2-8°C or at 18-25°C.
7. Patient Specimen Slides can be stored at 18-25°C.
8. A precipitate may form in the Enzyme Diluent. Should this occur do not try to redissolve it, there is no detrimental effect on the efficacy of the test.
9. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.

Specimen Collection, Storage and Pre-treatment

The assay is for use with human bronchoalveolar lavage and induced sputum specimens. Ideally, up to 30 mL bronchoalveolar lavage and 2-4 mL induced sputum should be collected into sterile vessels by appropriate procedures, and tested as soon as possible after collection. To inactivate any human immunodeficiency virus that may be present, it is strongly advised that the suspension of clinical material is diluted with an equal volume of absolute ethanol and incubated for ten minutes at room temperature (18-25°C) before processing. Dispose of waste materials in accordance with local regulations.

Sputum specimens should be pre-treated (homogenisation or incubation) by the addition of "Sputasol", "Sputolysin" or similar mucolytic agent for ten minutes at room temperature (18-25°C) before assay.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only.

Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions for kit reagents and clinical samples.
2. All patient samples should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5th Edition, 2007, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice.¹⁴
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The Anti-*P. carinii* Antibody and FITC-Conjugate contain sodium azide which can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, drain with large quantities of water to prevent azide build-up.
7. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Axis-Shield Diagnostics.



A ANTIBODY
Harmful



C ENZYME
Harmful

R22: Harmful if swallowed.

S23: Do not breathe fumes.

S29/35: Do not empty into drains, dispose of this material and its container in a safe way.

S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

R42: May cause sensitisation by inhalation.

S22: Do not breathe dust.

S29/35: Do not empty into drains, dispose of this material and its container in a safe way.

S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

S45: In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible)

S63: In case of accident by inhalation, remove casualty to fresh air and keep at rest.

PREPARATION

Materials/Equipment Required but not Provided

1. Precision pipettes to dispense 5 μ L, 15 μ L, 20 μ L and 200 μ L.
2. Centrifuge for volumes up to approximately 30 mL at 3,000 x g.
3. Distilled/ultrapure water.
4. Wash bottle containing distilled/ultrapure water.
5. Analar or equivalent grade acetone.
6. Analar or equivalent grade absolute ethanol.
7. Incubator at 37°C.
8. Humidified slide incubation chamber at 37°C.
9. Microscope coverslips, 18 x 18 mm and 50 x 20 mm.
10. Ultraviolet microscope equipped for viewing fluorescein and Evans Blue fluorescence.
11. Cytospin (e.g. Cytospin 2), optional.
12. Timer for 5 to 30 minutes.
13. Wicking/tissue material.
14. Appropriate mucolytic agent for induced sputum specimens, e.g. Sputolysin (Behring Diagnostic) or Sputasol (Oxoid). Use as recommended by the manufacturer; alternatively, use 0.1% Dithiothreitol (w/v) solution in a 1:1 ratio with specimen volume and incubate at 37°C for as long as required.
N.B. Dithiothreitol can irritate eyes and skin. If contact with skin or eyes occurs irrigate with water for at least 10 minutes. If discomfort exists, seek medical attention.
15. Phosphate-buffered saline.

Preparation for the Assay

Allow all reagents to equilibrate to room temperature.

Reconstitute lyophilised Enzyme with 200 μ L 0.001M HCl; this results in a 10X concentrate. Record the reconstitution date on the label and allow to stand at room temperature (18-25°C) for ten minutes. Mix gently by inversion, ensuring all particulate material is in solution. Reconstituted enzyme is stable for 3 months at 2-8°C.

ASSAY PROTOCOL

Pre-treatment of Specimens

Patient specimens should be tested as soon as possible after collection. When performing an assay be aware of the potential HIV status of specimens and take all the recommended precautions for dealing with such specimens.

Induced sputum specimens should be pre-treated with a mucolytic agent, e.g. Sputasol. Non-mucoid specimens such as BAL will normally not require the mucolytic procedure.

Protocol

1. Centrifuge specimens for 15 minutes at 3,000 x g, and wash the particulate/pelletable material in distilled/ultrapure water. Repeat once or twice, ensuring the pellet is fully resuspended between washes.
2. Resuspend the final pellet in a small amount of distilled/ultrapure water, such that the density of the material is not excessive, and vortex.
3. Spread 10-20 μ L over the entire area of one or more Patient Specimen Slide wells. Evaporate to dryness at 37°C. If a Cytospin (e.g. Cytospin 2) is available, spin 0.4 to 0.5 mL BAL or IS at 900 rpm, using one white and one tan filter.

4. Fix specimens by overlaying 1-2 drops Analar (or equivalent quality) acetone. Allow to evaporate at room temperature.
5. **Rinse Cytospin preparations with a stream of distilled/ultrapure water to remove salts from the specimen, as they reduce the efficacy of enzyme digestion.**
6. Air-dry slides.
7. **Dilute** the reconstituted Enzyme **1 in 10 (1+9) with Enzyme Diluent**. Dilute only enough reconstituted Enzyme for immediate requirements.
8. Overlay dried and fixed specimens with **20 µL** diluted Enzyme. Ensure the entire well area is covered by reagent.
9. Incubate slides for EXACTLY 30 minutes in a humidified chamber set at 37°C. Over-digestion of oocysts will result if incubation is continued for more than 30 minutes. Oocysts may become less characteristic and less readily identifiable.
10. Rinse slides with distilled/ultrapure water by running a stream of water over the surface of the wells. Do not direct the jet directly at the specimen.
11. Wick and air-dry the slides.
12. Add **15 µL** anti-*P. carinii* Antibody to specimens. Ensure that the entire well area is covered by reagent. Incubate in a humidified chamber for 15 minutes at 37°C.
13. Rinse wells as described in step 10, wick and air-dry.
14. Add **15 µL** FITC-Conjugated Anti-Mouse Antibody to specimens. Ensure that the entire well area is covered by reagent. Incubate in a humidified chamber for 15 minutes at 37°C.
15. Rinse wells, wick and air-dry.
16. Place a drop of Mounting Medium onto every well in use and apply a coverslip of appropriate size. Invert the slide on an absorbent tissue and gently press to exclude excess Mounting Medium and air bubbles.
17. Examine specimens for bright to medium bright apple-green oocysts, which may be evenly or unevenly labelled. Cellular debris and other material may be counterstained with Evans Blue, which will fluoresce red. Examine the entire specimen area.

INTERPRETATION OF RESULTS

POSITIVE RESULT - Five or more fluorescent oocysts over the whole slide.

EQUIVOCAL RESULT - One to five fluorescent oocysts.

NEGATIVE RESULT - No fluorescent oocysts. If *P. carinii* infection is still suspected, repeat the assay with a heavier inoculum.

PERFORMANCE DATA

CENTRE 1¹⁰

223 BAL and IS specimens from HIV patients with respiratory tract symptoms were evaluated and compared with modified Grocott stain. Overall agreement = 90.6%.

Of 21 (9.4%) discrepant results, six subsequent specimens were obtained, and five out of six results were positive by both tests.

CENTRE 2⁸

135 IS specimens were evaluated and compared with Grocott stain. Overall agreement = 88.9%.

Fifteen results (11.1%) were Detect IF *P. carinii* positive/equivocal and Grocott negative. The authors concluded that this indicates an increased sensitivity for *P. carinii* in cytological preparations of IS with the immunofluorescence technique compared to conventional stains.

CENTRE 3⁹

254 BAL and IS specimens from 75 patients with AIDS, other immunocompromised patients, including transplant patients, and patients diagnosed as 'atypical pneumonia' were evaluated and compared with Grocott stain. Overall agreement = 94.1%.

Fifteen results (5.9%) were Detect IF *P. carinii* positive/equivocal and Grocott negative. The authors concluded that the Detect IF test was more reliable and sensitive than the Grocott technique.

CENTRE 4⁶

50 BAL and 50 IS specimens were tested for *P. carinii* infection using indirect immunofluorescence, direct immunofluorescence, modified Wright-Giemsa stain and modified silver stain. A positive specimen was defined as any smear which was positive by two or more methods.

Using this definition, the sensitivity and specificity of DETECT IF *P. carinii* were as follows.

BAL Sensitivity = 86% Specificity = 100%

IS Sensitivity = 97% Specificity = 100%

CENTRE 5

152 BAL specimens from patients with clinical evidence of *P. carinii* pneumonia were evaluated and compared with Grocott stain. Results for each method were compared to the clinical evidence of *P. carinii* pneumonia (PCP). In five cases, the clinical evidence result was equivocal; four were Detect IF positive and Grocott negative, one was Grocott positive and Detect IF negative.

Overall agreement of DETECT IF with clinical evidence of PCP = $\frac{146}{147} = 99.3\%$ (one result was equivocal with IF)

Overall agreement of Grocott stain with clinical evidence of PCP = $\frac{140}{147} = 95.2\%$

Overall agreement of DETECT IF with Grocott = 94.5%

LIMITATIONS OF USE

1. A negative result does not exclude the possibility of *P. carinii* infection. Results should be interpreted in light of all clinical and diagnostic information. If necessary, obtain a further specimen.
2. Excess mucous in specimens may prevent adequate staining.
3. The FITC-conjugated anti-mouse antibody has the potential to cross-react with *Candida albicans* when present in patient samples which can be misinterpreted as false positive results.¹⁵

La trousse DETECT IF *Pneumocystis Carinii* (*P. carinii*) permet la détection qualitative des oocystes de *P. carinii* dans les échantillons d'expectorations induites et les liquides de lavage broncho-alvéolaire humains par immunofluorescence indirecte. Elle est conçue pour étayer le diagnostic en cas de suspicion d'une infection à *P. carinii*. Les résultats du test doivent cependant être interprétés en fonction de l'ensemble des informations cliniques et diagnostiques.

INTRODUCTION

Pneumocystis carinii est un micro-organisme eucaryote de taxonomie incertaine. Des études récentes de l'ADN ribosomal ont mis en évidence des séquences d'acide nucléique homologues à celles de certains champignons, mais la classification de cet organisme fait encore l'objet de discussions.¹

P. carinii est ubiquiste, infectant l'homme et d'autres mammifères ; l'infection est supposée se transmettre par voie aérienne.¹ Il s'agit d'un pathogène majeur chez les patients immunodéprimés, en particulier les patients présentant le SIDA^{2,3} chez lesquels il représente une cause établie d'infection pulmonaire. La malnutrition, les cancers hématologiques, les collagénoses vasculaires, la déficience immunitaire des cellules primaires et les traitements immunosuppresseurs, administrés par exemple à des patients transplantés ou des patients leucémiques prenant des médicaments cytotoxiques, sont autant de facteurs qui augmentent le risque d'une infection à *P. carinii*.




La survenue d'une pneumonie à *P. carinii* peut être rapide ou s'installer insidieusement. Les signes cliniques caractéristiques sont : rythme respiratoire accéléré et fièvre en clocher. La radiographie du thorax montre un infiltrat diffus ; les tests de la fonction pulmonaire mettent en évidence un bloc alvéolo-capillaire résultant de la perturbation des échanges gazeux dans les alvéoles, ce qui entraîne une hypoxémie et une hypercapnie.

Actuellement, le diagnostic d'une pneumonie à *P. carinii* s'effectue par la détection de *P. carinii* dans les biopsies pulmonaires, les liquides de lavage broncho-alvéolaire^{4,5} ou les expectorations induites. Il est possible de visualiser l'organisme grâce à diverses colorations non spécifiques, notamment la méthénamine argentique de Gomori, le bleu de O-toluidine, les colorations de Gram-Weigert, de Giemsa et de Wright-Giemsa. Dans la mesure où ces colorants réagissent avec les levures et d'autres structures, *P. carinii* sera identifié d'après sa morphologie propre. Les techniques de coloration demandent beaucoup de temps et nécessitent souvent un haut niveau de compétence technique dans l'interprétation des résultats. Des anticorps monoclonaux spécifiques des oocystes de *P. carinii* sont désormais disponibles, permettant le développement de techniques d'immunofluorescence pour identifier rapidement et avec certitude les oocystes de *P. carinii* dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire^{6,7} et les expectorations induites.^{8,9} La trousse Detect IF *P. carinii* utilise un anticorps monoclonal d'origine murine qui réagit spécifiquement avec *P. carinii*, que ce dernier provienne d'échantillons humains ou de rongeurs, en vue de détecter et d'identifier de façon simple et rapide le micro-organisme dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (BAL) et les expectorations induites (EX).

PRINCIPE DU TEST

Les échantillons de liquides de lavage broncho-alvéolaire ou d'expectorations induites prélevés avant tout traitement sont centrifugés et lavés. Les culots sont remis en suspension, étalés sur des lames de microscope et fixés. Les échantillons sont digérés par une enzyme. Ils sont ensuite mis à réagir avec l'anticorps monoclonal anti-*P. carinii* murin puis avec un anticorps anti-souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine : après rinçage, séchage et montage, les échantillons sont examinés au microscope à fluorescence. Les oocystes se présentent comme des éléments fluorescents vert pomme plus ou moins brillants et peuvent être marqués de manière uniforme ou irrégulière. La présence d'oocystes de *P. carinii* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire ou les expectorations indique une infection à *P. carinii*.

COMPOSITION DE LA TROUSSE

REAG A	Anticorps monoclonal anti- <i>P. carinii</i>	1 × 1 mL	Anticorps monoclonal de souris dirigé contre les oocystes de <i>P. carinii</i> , sérum albumine bovine, 0,1% (poids/volume) d'azoture de sodium. Prêt à l'emploi.	Xn 
REAG B	Anticorps anti-souris conjugué au FITC	1 × 1 mL	Anticorps anti-souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), contre-colorant Bleu Evans. Prêt à l'emploi.	
REAG C	Enzyme (Lyophilisée)	1 flacon	Enzyme pour le traitement des échantillons cliniques. A reconstituer dans 200 µL de HCl 0,001 M (fourni) et à diluer avant emploi.	Xn 
REAG D	Acide chlorhydrique dilué (HCl 0,001 M)	1 × 0,5 mL	Pour reconstitution de l'enzyme. Prêt à l'emploi.	
REAG E	Diluant de l'enzyme	1 × 3 mL	Tampon Tris contenant un activateur d'enzyme. Prêt à l'emploi.	
SPCM SLD	Lames pour échantillons patients	25 lames	Lames revêtues de PTFE (jaunes) à quatre puits.	
REAG F	Milieu de montage	2 × 3 mL	Glycérol contenant un tampon phosphate et un stabilisateur, Citifluor. Prêt à l'emploi.	

CONSERVATION DES REACTIFS

Conseils d'utilisation

1. Conserver les éléments de la trousse entre 2 et 8°C et utiliser ceux-ci avant la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Ne pas utiliser de réactifs périmés.
2. Ne pas mélanger des éléments de trousse différentes.
3. Ne pas congeler les trousse.
4. L'enzyme lyophilisée doit être reconstituée avant usage, voir le chapitre « Préparation du test ». Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Après reconstitution dans 200 µL de HCl 0,001 M, l'enzyme lyophilisée est stable pendant 3 mois à compter de la date de la reconstitution, à condition d'être conservée entre 2 et 8°C.
6. Conserver le milieu de montage à l'abri de toute source de lumière directe. Conserver entre 2 et 8°C ou à 18-25°C.
7. Les lames pour échantillons patients peuvent être conservées à température ambiante (18-25°C).
8. Il est possible qu'un précipité apparaisse dans le diluant de l'enzyme. Le cas échéant, ne pas tenter de le redissoudre, il ne compromet en rien l'efficacité du test.
9. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser une nouvelle pipette jetable pour chaque manipulation d'un réactif ou d'un échantillon.

Prélèvement, conservation et pré-traitement des échantillons

Le test s'applique aux échantillons de liquides de lavage broncho-alvéolaire humains et d'expectorations induites. Idéalement, jusqu'à 30 mL de liquide de lavage broncho-alvéolaire et de 2 à 4 mL d'expectoration devraient être prélevés dans des récipients stériles selon des modes opératoires appropriés, et testés aussi tôt que possible après leur recueil. Afin d'inactiver le virus de l'immunodéficience humaine éventuellement présent, il est fortement recommandé de diluer l'échantillon clinique dans un volume égal d'éthanol absolu et d'incuber pendant dix minutes à température ambiante (18-25°C) avant de réaliser le test. Les déchets seront éliminés conformément à la réglementation en vigueur.

Les expectorations devraient être pré-traitées par addition de "Sputasol", "Sputolysin" ou d'un agent mucolytique similaire, pendant dix minutes à température ambiante (18-25°C) avant le test.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS D'EMPLOI

Pour usage diagnostique in vitro.

Consignes de sécurité

1. Respecter strictement les instructions de cette notice, en particulier en ce qui concerne les conditions de manipulation et de conservation des réactifs de la trousse et des échantillons cliniques.
2. Tous les échantillons patients doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés avec les mêmes précautions que tout autre matière biologique potentiellement dangereuse. Le Manuel de Santé des CDC/NIH, "Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux", 5^e édition, 2007, décrit les Bonnes Pratiques de Laboratoire qui s'appliquent à la manipulation de ces matières.¹⁴
3. Ne pas pipeter à la bouche.

4. Ne pas fumer, manger, boire ni appliquer des produits cosmétiques dans les zones où sont manipulés les trousse et les échantillons.
5. Toute coupure, abrasion ou lésion quelconque de la peau doit être correctement protégée.
6. L'anticorps anti-*P. carinii* et l'anticorps conjugué au FITC contiennent de l'azoture de sodium. Ce composé est susceptible de réagir avec le plomb et le cuivre des canalisations et former ainsi des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination de ces réactifs, rincer abondamment à l'eau afin d'éviter l'accumulation d'azotures.
7. Les fiches de sécurité de tous les composés dangereux contenus dans cette trousse sont disponibles sur simple demande auprès de Axis-Shield Diagnostics.



A ANTICORPS
Nocif



C ENZYME
Nocif

R22: Nocif en cas d'ingestion

S23: Ne pas respirer les vapeurs

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage

R42: Peut entraîner une sensibilisation par inhalation

S22: Ne pas respirer les poussières

S29/35: Ne pas jeter les résidus à l'égout; ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toute précaution d'usage

S36/37/39: Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage

S45: En cas d'accident ou de malaise consulter immédiatement un médecin (si possible lui montrer l'étiquette)

S63: En cas d'accident par inhalation, transporter la victime hors de la zone contaminée et la garder au repos

P R E P A R A T I O N

Matériels/Equipements nécessaires mais non fournis

1. Pipettes de précision permettant de délivrer 5 µL, 15 µL, 20 µL et 200 µL.
2. Centrifugeuse pour des volumes allant jusqu'à 30 mL environ, à 3.000 x g.
3. Eau distillée/ultrapure.
4. Pissette contenant de l'eau distillée/ultrapure.
5. Acétone de qualité analytique ou équivalente.
6. Ethanol absolu de qualité analytique ou équivalente.
7. Incubateur à 37°C.
8. Chambre d'incubation humidifiée pour lames de microscope, à 37°C.
9. Lamelles couvre-objet, 18 x 18 mm et 50 x 20 mm.
10. Microscope UV équipé pour détecter la fluorescence de la fluoroscéine et du Bleu Evans.
11. Cytocentrifugeuse (par ex. Cytospin 2), facultatif.
12. Minuteur de 5 à 30 minutes.
13. Papier absorbant.
14. Agent mucolytique approprié pour les expectorations, par exemple Sputolysin (Behring Diagnostic) ou Sputasol (Oxoid). Utiliser conformément aux recommandations du fabricant, ou utiliser une solution de dithiothréitol à 0,1% (poids/volume), dans une proportion de 1/1 par rapport au volume de l'échantillon, et incubé à 37°C pendant le temps requis.
N.B. Le dithiothréitol est irritant pour les yeux et la peau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau pendant au moins 10 minutes. Si la gêne persiste, consulter un médecin.
15. Solution saline de tampon phosphate.

Préparation du test

Laisser tous les réactifs s'équilibrer à température ambiante.

Reconstituer l'enzyme lyophilisée dans 200 µL de HCl 0,001 M ; on obtient ainsi une solution concentrée 10X. Noter la date de reconstitution sur l'étiquette et laisser reposer à température ambiante (18-25°C) pendant dix minutes. Mélanger avec précaution en retournant le récipient, jusqu'à dissolution complète des particules en suspension. L'enzyme reconstituée est stable pendant 3 mois à 2-8°C.

MODE OPERATOIRE

Pré-traitement des échantillons

Les échantillons patients doivent être testés dès que possible après leur prélèvement. Lors de la réalisation du test, ne pas oublier le statut VIH potentiel des échantillons et prendre toutes les mesures de précaution recommandées pour la manipulation de tels échantillons.

Les expectorations doivent être préalablement traitées par un agent mucolytique tel que Sputasol. Les échantillons non mucoïdes tels que les liquides de lavage broncho-alvéolaire ne nécessitent généralement aucune procédure de mucolyse.

Protocole opératoire

1. Centrifuger les échantillons pendant 15 minutes à 3.000 x g, et laver le culot à l'eau distillée ou ultrapure. Répéter l'opération une ou deux fois, en veillant à remettre le culot en suspension entre les lavages.
2. Remettre le culot final en suspension dans une petite quantité d'eau distillée ou ultrapure, de telle manière que la densité du mélange ne soit pas excessive, et passer au vortex.
3. Etaler 10-20 µL d'échantillon ainsi préparé sur la totalité de la surface d'un ou de plusieurs puits d'une lame pour échantillons patients. Evaporer jusqu'à dessiccation à 37°C. Si l'on dispose d'une cyto centrifugeuse (par ex., Cytospin 2), centrifuger 0,4 à 0,5 mL de liquide de lavage broncho-alvéolaire ou d'expectoration à 900 trs/min, en utilisant un filtre blanc et un filtre brun clair.
4. Fixer les échantillons en les recouvrant d'une ou deux gouttes d'acétone de qualité analytique ou équivalente. Laisser évaporer à température ambiante.
5. **En cas de préparation au Cytospin, rincer après fixation avec un filet d'eau distillée ou ultrapure afin d'éliminer les sels contenus dans l'échantillon, dans la mesure où ceux-ci réduisent l'efficacité de la digestion enzymatique.**
6. Sécher les lames à l'air.
7. **Diluer** l'enzyme reconstituée au **1/10 dans le diluant de l'enzyme(1+9)**. Ne préparer que la quantité nécessaire pour une utilisation immédiate.
8. Recouvrir les lames des échantillons séchés et fixés et les lames des contrôles positifs avec **20 µL** d'enzyme diluée. S'assurer que le réactif recouvre la totalité de la surface des puits.
9. Incuber les lames pendant 30 minutes EXACTEMENT dans une chambre humide thermostatée à 37°C. La poursuite de l'incubation au-delà de 30 minutes peut avoir pour conséquence une digestion excessive des oocystes, les rendant ainsi moins caractéristiques et moins aisément identifiables.
10. Rincer les lames à l'eau distillée ou ultrapure en laissant couler un filet d'eau à la surface des puits. Eviter d'orienter le jet directement sur l'échantillon.
11. Éponger l'excès de liquide et sécher les lames à l'air.
12. Ajouter **15 µL** d'anticorps anti-*P. carinii* sur les puits contenant les échantillons. Veiller à ce que les puits soient recouverts de réactif sur toute leur surface. Incuber dans une chambre humide pendant 15 minutes à 37°C.
13. Rincer les puits comme décrit dans l'étape 10, éponger et sécher à l'air.
14. Ajouter **15 µL** d'anticorps anti-souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine. Veiller à ce que les puits soient recouverts de réactif sur toute leur surface. Incuber dans une chambre humide pendant 15 minutes à 37°C.
15. Rincer les puits, éponger et sécher à l'air.
16. Déposer une goutte de milieu de montage sur chaque puits utilisé et recouvrir d'une lamelle couvre-objet de dimension adaptée. Retourner la lame sur un papier absorbant et presser doucement pour éliminer l'excès de milieu de montage et les bulles d'air.
17. Examiner les échantillons et rechercher la présence d'oocystes fluorescents de couleur vert pomme plus ou moins brillants. Les oocystes peuvent être marqués de manière uniforme ou irrégulière. Les débris cellulaires et d'autres matières peuvent avoir été contre-colorées par le Bleu Evans, et donner une fluorescence rouge. Examiner la totalité de la surface de l'échantillon.

INTERPRETATION DES RESULTATS

RESULTAT POSITIF - Présence d'au moins cinq oocystes sur la totalité de la lame.

RESULTAT INTERMEDIAIRE - Présence d'un à cinq oocystes sur la lame.

RESULTAT NEGATIF - Absence d'oocystes fluorescents. En cas de suspicion d'une infection à *P. carinii*, répéter le test en utilisant une plus grande quantité d'inoculum.

PERFORMANCES

CENTRE 1¹⁰

223 échantillons de liquides de lavage broncho-alvéolaire et d'expectorations provenant de patients porteurs du VIH et présentant des symptômes respiratoires ont été soumis au test et les résultats comparés à ceux obtenus avec une version modifiée de la coloration de Grocott. La concordance globale a été de 90,6%.

Sur 21 (9,4%) résultats discordants, six échantillons ont été obtenus ultérieurement, et cinq d'entre eux se sont avérés positifs pour les deux tests.

CENTRE 2⁸

135 échantillons d'expectorations induites ont été soumis au test et les résultats comparés à ceux obtenus avec la coloration de Grocott. La concordance globale a été de 88,9%.

Quinze échantillons (11,1%) ont montré un résultat positif ou intermédiaire avec la trousse Detect IF *P. Carinii* et négatif avec la coloration de Grocott. Les évaluateurs ont conclu que cette discordance traduisait une sensibilité supérieure de la technique d'immunofluorescence par rapport aux techniques de coloration classique.

CENTRE 3⁹

254 échantillons de liquides de lavage broncho-alvéolaire et d'expectorations provenant de 75 patients présentant le SIDA, d'autres patients immunodéprimés, y compris des patients transplantés, et des patients diagnostiqués porteurs d'une « pneumonie atypique » ont été soumis au test et les résultats comparés à ceux obtenus avec la technique de coloration de Grocott. La concordance globale a été de 94,1%.

Quinze échantillons (5,9%) ont été trouvés positifs ou intermédiaires avec la trousse Detect IF *P. Carinii* et négatifs avec la coloration de Grocott. Les auteurs en ont conclu que le test Detect IF *P. Carinii* était plus fiable et plus sensible que la coloration de Grocott.

CENTRE 4⁶

50 échantillons de liquides de lavage broncho-alvéolaire (BAL) et 50 échantillons d'expectorations (EX) ont été testés pour une infection à *P. carinii* par immunofluorescence indirecte, immunofluorescence directe, coloration de Wright-Giemsa modifiée et une coloration argentique modifiée. Un échantillon était considéré comme positif lorsque la présence de *P. carinii* était avérée par au moins deux des méthodes testées.

En utilisant cette définition, la sensibilité et la spécificité de Detect IF *P. Carinii* étaient les suivantes.

BAL Sensibilité = 86% Spécificité = 100%

EX Sensibilité = 97% Spécificité = 100%

CENTRE 5

152 échantillons de liquide de lavage broncho-alvéolaire provenant de patients présentant des signes cliniques de pneumonie à *P. carinii* ont été soumis au test et les résultats comparés à ceux obtenus avec la coloration de Grocott. Les résultats obtenus avec l'une et l'autre de ces méthodes ont été confrontés aux signes cliniques de pneumonie à *P. carinii* (PPC). Dans cinq cas, les résultats des observations cliniques étaient équivoques ; parmi ceux-ci, quatre étaient positifs avec Detect IF *P. Carinii* et négatifs au Grocott, le dernier étant positif au Grocott et négatif avec Detect IF *P. Carinii*.

Concordance globale de Detect IF *P. Carinii* avec les signes cliniques $\frac{146}{147}$ = 99,3% (un résultat était intermédiaire par IF)

Concordance globale de la coloration de Grocott avec les signes cliniques de PPC = $\frac{140}{147}$ = 95,2%

Concordance globale de Detect IF *P. Carinii* avec la coloration de Grocott = 94,5%

LIMITES D'UTILISATION

1. Un résultat négatif n'exclut pas la possibilité d'une infection à *P. carinii*. Les résultats doivent être interprétés après confrontation de l'ensemble des informations cliniques et diagnostiques. Si nécessaire, prélever un second échantillon.
2. Un excès de mucus dans les échantillons est susceptible de perturber la coloration.
3. L'anticorps anti-souris conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) a le potentiel de provoquer une réaction croisée avec *Candida albicans* lorsqu'il est présent dans les échantillons des patients, ce qui peut être interprété à tort comme un résultat faux-positif.¹⁵

La prueba *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) de Detect IF es un kit de inmunofluorescencia cualitativa indirecta para la detección de oocistos *P. carinii* en fluido humano de lavado broncoalveolar y esputo inducido. Está indicada como ayuda en el diagnóstico de lo que se sospecha que puede ser una infección *P. carinii*. Los resultados deben ser interpretados a la luz de todos los datos clínicos y diagnósticos.

INTRODUCCIÓN

Pneumocystis carinii es un microorganismo eucariótico de taxonomía incierta. Estudios recientes de homología ribosomal RNA han mostrado secuencias de ácido nucleico idénticas con algunos hongos, pero la clasificación del organismo es todavía tema de discusión.¹

P. carinii es omnipresente, e infecta al hombre y otros mamíferos; se supone que la ruta de infección es la transmisión por el aire.¹ Es un importante patógeno en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en el caso de pacientes con sida^{2,3} en los cuales es una conocida causa de infección pulmonar. Entre los factores que hacen aumentar la posibilidad de infección con neumonía *P. carinii* están: la inanición, las malignidades hematológicas, las enfermedades vasculares colagénicas, la inmunodeficiencia celular primaria y la terapia inmunosupresiva, por ejemplo en pacientes de trasplante y pacientes con leucemia que toman fármacos citotóxicos.




El comienzo de la neumonía *P. carinii* puede ser rápido y a la vista, o bien puede presentarse de modo insidioso. Cuando es clínicamente evidente, sus características son aceleración en el ritmo respiratorio y fiebre espigante. Las radiografías de tórax muestran una infiltración difusa; las pruebas de funciones pulmonares muestran bloque alveolo-capilar que resulta de un intercambio deteriorado de gases en los alvéolos que causa hipoxemia e hipercapnia.

En la actualidad la neumonía *P. carinii* puede ser diagnosticada mediante la observación de *P. carinii* en pulmón abierto o en material de biopsia pulmonar transbronquial, el lavado broncoalveolar^{4,5} o el esputo inducido. Se puede visualizar con diversos tipos de coloraciones no específicas, entre las que se incluyen metenamina-plata Gomori, azul de toluidina O, Gram-Weigert, Giemsa y Wright-Giemsa. Como todas estas coloraciones reaccionan con las levaduras y otras estructuras, es necesario distinguir *P. carinii* sobre la base de morfología. Las técnicas de coloración llevan mucho tiempo y con frecuencia requieren un alto nivel de conocimientos técnicos en la interpretación de resultados. Se han conseguido ya anticuerpos monoclonales específicos para oocistos *P. carinii*, lo que permite ahora el desarrollo de técnicas de inmunofluorescencia para identificar de forma rápida e inequívoca los oocistos *P. carinii* en material broncoalveolar^{6,7} y esputo inducido.^{8,9} En la prueba *P. carinii* de Detect IF se utiliza un reactivo de anticuerpo monoclonal murino con *P. carinii* humano o de roedores en un test simple y rápido para la detección e identificación de *P. carinii* en el fluido humano de lavado broncoalveolar (BAL) y el esputo inducido (IS).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Las muestras de fluido de lavado broncoalveolar o de esputo inducido pre-tratado son centrifugadas y lavadas. Los gránulos son suspendidos de nuevo, colocados en platinas y fijados. Las muestras son digeridas por enzimas. Se agrega anticuerpo murino anti-*P. carinii* y anticuerpo anti-ratón etiquetados fluorescentemente, uno tras otro, tras los pasos de incubación, enjuague, absorción de exceso de humedad y secado al aire. Al mirar con un microscopio de fluorescencia, se muestran los oocistos en color verde manzana entre medio-brillante y brillante, y pueden ser etiquetados de modo uniforme o no uniforme. La presencia de oocistos de *P. carinii* en el fluido de lavado broncoalveolar o en el esputo inducido es indicadora de infección *P. carinii*.

COMPONENTES DEL KIT

REAG A	Anticuerpo monoclonal anti- <i>P. carinii</i>	1 × 1 mL	Anticuerpo monoclonal murino anti- <i>P. carinii</i> , albúmina de suero bovino, 0.1% (w/v) azida de sodio. Listo para su uso.	Xn 
REAG B	Anticuerpo FITC-conjugado anti-ratón	1 × 1 mL	Anticuerpo anti-ratón conjugado de isocianato de fluorescina (FITC), contracolorante azul de Evans. Listo para su uso.	
REAG C	Enzima (Liofilizada)	1 vial	Enzima de pre-tratamiento para muestras clínicas. Reconstituir con 200 µL 0.001M HCl (provisto) y diluir antes de usar.	Xn 
REAG D	Dilución de ácido hidrolórico (0.001M HCl)	1 × 0.5 mL	Para reconstitución de enzima. Listo para su uso.	
REAG E	Diluyente de enzima	1 × 3 mL	Estabilizador Tris con activador de enzima. Listo para su uso.	
SPCM SLD	Platinas con muestras del paciente	25 platinas	Platinas PTFE-revestidas (en amarillo) con cuatro pozos o huecos cuadrados para muestras.	
REAG F	Vehículo de absorción	2 × 3 mL	Glicerol de estabilización de fosfato, retardante Citifluor descolorante. Listo para su uso.	

ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Notas sobre manejo y procedimientos

- Los componentes del kit se deben almacenar a 2-8°C y usar con anterioridad a la fecha de caducidad que figura en las etiquetas. No se deben utilizar reactivos que han caducado.
- No se deben mezclar diferentes kits.
- Los kits no deben ser congelados.
- La enzima liofilizada debe ser reconstituida previamente a su uso, véase la sección sobre Preparación del Ensayo. Todos los demás reactivos están listos.
- Tras la reconstitución con 200 µL 0.001M HCl, la enzima liofilizada permanecerá estable hasta 3 meses después de la fecha de su reconstitución si es almacenada a 2-8°C.
- No se debe exponer el vehículo de absorción a la luz directa durante su almacenamiento. Se debe almacenar a 2-8°C o a 18-25°C.
- Las platinas de muestras del paciente se pueden almacenar a 18-25°C.
- Es posible que se forme un precipitado en el diluyente de la enzima. Si esto sucede, no se debe tratar de disolver de nuevo, puesto que este fenómeno no tiene efecto negativo en la eficacia de la prueba.
- Se debe evitar la contaminación de los reactivos. Se recomienda emplear una punta desechable de pipeta para cada reactivo o cada manipulación de la muestra.

Recogida, almacenamiento y pre-tratamiento de muestras

El ensayo está indicado para su uso con muestras humanas de lavado broncoalveolar y de esputo inducido. Idealmente, deben recogerse hasta 30 mL de lavado broncoalveolar y 2-4 mL de esputo inducido en vasijas estériles mediante procedimientos apropiados, siendo sometido todo a pruebas lo más pronto posible tras su recolección. Para desactivar los virus de inmunodeficiencia humana que pueda haber presentes, se recomienda encarecidamente que la suspensión del material clínico sea diluida con un volumen igual de etanol absoluto y sea incubada durante diez minutos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de proceder a su procesamiento. Los materiales de desecho deben ser eliminados cumpliendo las normativas locales.

Las muestras de esputo deben ser pre-tratadas (homogeneización o incubación) mediante la adición de "Sputasol", "Sputolysin" o un agente mucolítico similar durante diez minutos a temperatura ambiente (18-25°C) anteriormente al ensayo.

AVISOS Y PRECAUCIONES

Para el diagnóstico *in vitro* únicamente.

Precauciones de seguridad

1. Adherencia estricta a las instrucciones formuladas en este folleto, en especial en lo relativo a las condiciones de manejo y almacenamiento para los reactivos del kit y las muestras clínicas.
2. Todas las muestras de pacientes deben ser consideradas potencialmente infecciosas y deben ser manejadas con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. En el Manual de Sanidad CDC/NIH titulado "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en los laboratorios microbiológicos y biomédicos), 5ª edición, 2007, se explica cómo deben ser manejados estos materiales de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio.¹⁴
3. No se debe hacer pipetación usando la boca.
4. No se debe fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en las zonas en que se manejan los kits y las muestras.
5. Deben quedar adecuadamente protegidas las dolencias, cortes, quemaduras y otras lesiones de la piel.
6. El anticuerpo anti-*P. carinii* y el conjugado FITC contienen azida de sodio que puede reaccionar con tuberías de plomo o cobre formando azidas de metal altamente explosivas. En su eliminación, se debe evacuar usando agua abundante para impedir que se forme la azida.
7. Se pueden solicitar a Axis-Shield Diagnostics hojas sobre los datos de seguridad material de todos los componentes peligrosos de este kit.



A ANTICUERPO
Nocivo



C ENZIMA
Nocivo

R22: Nocivo por ingestión

S23: No respirar los humos

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara

R42: Posibilidad de sensibilización por inhalación

S22: No respirar el polvo

S29/35: No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles

S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara

S45: En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (se es posible, muéstrele la etiqueta)

S63: En caso de accidente por inhalación, alejar a la víctima de la zona contaminada y mantenerla en reposo

PREPARACIÓN

Materiales/equipo necesario pero no provisto

1. Pipetas de precisión para dispensar 5 µL, 15 µL, 20 µL y 200 µL.
2. Centrífugo para volúmenes de hasta 30 mL a 3,000 x g aproximadamente.
3. Agua destilada/ultrapura.
4. Frasco de lavado con agua destilada/ultrapura.
5. Acetona analar o de grado equivalente.
6. Etanol absoluto analar o de grado equivalente.
7. Incubadora a 37°C.
8. Cámara humidificada de incubación de platinas a 37°C.
9. Cubridores de microscopio de 18 x 18 mm y 50 x 20 mm.
10. Microscopio ultravioleta equipado para examinar fluorescencia y fluorescencia de azul Evans.
11. Cytospin (por ejemplo, Cytospin 2), opcional.
12. Cronómetro de 5 a 30 minutos.
13. Material/papel absorbente de humedad.

14. Un agente mucolítico apropiado para las muestras de esputo inducido, por ejemplo Sputolysin (Diagnóstico Behring) o Sputasol (oxoide). Se debe usar de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; de modo alternativo, se puede emplear una solución de 0.1% de ditiotreitól (w/v) en una proporción de 1:1 con volumen de muestra e incubar a 37°C durante el tiempo que haga falta.
N.B. El ditiotreitól puede irritar los ojos y la piel. Si entra en contacto con los ojos, regar con agua durante por lo menos 10 minutos. Si persiste la molestia, se debe acudir al médico.
15. Solución salina estabilizada con fosfato.

Preparación del ensayo

Se debe permitir que todos los reactivos se equilibren a la temperatura ambiental.

Se reconstituye la enzima liofilizada con 200 µL 0.001M HCl, lo cual resulta en un concentrado 10X. Se debe registrar la fecha de la reconstitución en la etiqueta y dejar que repose a temperatura ambiental (18-25°C) durante diez minutos. Se mezcla suavemente mediante inversión, asegurándose de que todo el material particulado esté en solución. La enzima reconstituida permanece estable durante 3 meses a 2-8°C.

PROTOCOLO DEL ENSAYO

Pre-tratamiento de las muestras

Las muestras de pacientes deben ser sometidas a pruebas tan pronto como sea posible después de su recolección. En la realización del ensayo el operario debe ser consciente del potencial estado de las muestras en cuanto a VIH y tomar todas las precauciones recomendadas para trabajar con este tipo de muestras.

Las muestras de esputo inducido deben recibir pre-tratamiento con un agente mucolítico, por ejemplo, Sputasol. Las muestras no mucoides como BAL normalmente no requieren ser sometidas al procedimiento mucolítico.

Protocolo

1. Centrifugar las muestras durante 15 minutos a 3,000 x g, y lavar el material particulado/granulable en agua destilada/ultrapura. Repetir una o dos veces, asegurándose de que el gránulo es completamente re-suspendido entre los lavados.
2. Re-suspender el gránulo final en una pequeña cantidad de agua destilada/ultrapura, de tal forma que la densidad del material no sea excesiva, y vorticiar.
3. Extender 10-20 µL sobre la superficie total de un pozo/hueco (o más de uno) de las platinas de muestras del paciente. Dejar que se evapore a 37°C hasta quedar seco. Si se dispone de un Cytospin (por ejemplo, Cytospin 2), hacer girar 0.4 a 0.5 mL BAL o IS a 900 rpm, usando un filtro blanco y otro marrón.
4. Fijar las muestras recubriéndolas con 1-2 gotas de acetona analar (o de calidad equivalente). Dejar evaporar a temperatura ambiente.
5. **Enjuagar los preparados de Cytospin con un chorro de agua destilada/ultrapura para eliminar las sales de la muestra, puesto que reducen la eficacia de la digestión de enzimas.**
6. Dejar que se sequen al aire las platinas.
7. **Diluir la enzima reconstituida a 1 en 10 (1+9) con diluyente de enzima.** Diluir solamente la enzima reconstituida que haga falta para uso inmediato.
8. Extender **20 µL** de enzima diluida por encima de las muestras secas y fijadas, asegurándose de que toda la superficie quede bien cubierta por el reactivo.
9. Incubar las platinas durante EXACTAMENTE 30 minutos en una cámara humidificada calibrada a 37°C. Si se continúa durante más de 30 minutos, el resultado será una excesiva digestión de los oocistos. Los oocistos podrían hacerse menos característicos y más difíciles de identificar.
10. Enjuagar las platinas con agua destilada/ultrapura haciendo correr un chorro de agua por encima de la superficie de los pozos. No se debe dirigir el chorro directamente a la muestra.
11. Enjuagar con papel absorbente y dejar secar del todo al aire las platinas.
12. Agregar **15 µL** de anticuerpo anti-*P. carinii* a las muestras. Asegurarse de que toda la superficie quede recubierta con el reactivo. Incubar en una cámara humidificada durante 15 minutos a 37°C.
13. Enjuagar los pozos/huecos tal como se explica en el apartado 10, enjuagar con papel absorbente y dejar secar al aire.
14. Agregar a las muestras **15 µL** de anticuerpo conjugado FITC anti-ratón. Asegurarse de que toda la superficie quede recubierta con el reactivo. Incubar en una cámara humidificada durante 15 minutos a 37°C.
15. Enjuagar los pozos, enjuagar con papel absorbente y dejar secar al aire.

16. Colocar una gota de vehículo de absorción en cada pozo que se esté usando y aplicar un cubridor del tamaño apropiado. Invertir la platina en papel absorbente y presionar ligeramente para excluir el exceso de vehículo de absorción y las burbujas de aire.
17. Examinar las muestras para ver si hay oocistos de color verde naranja brillante o medio brillante, que pueden ser etiquetados de modo uniforme o no uniforme. A los residuos celulares se puede aplicar contracolorante azul de Evans, que tendrán una fluorescencia roja. Examinar toda la superficie de la muestra.

I N T E R P R E T A C I Ó N D E R E S U L T A D O S

RESULTADO POSITIVO – Cinco o más oocistos fluorescentes en toda la platina.

RESULTADO EQUÍVOCO – Entre uno y cinco oocistos fluorescentes.

RESULTADO NEGATIVO – No hay oocistos fluorescentes. Si se sospecha todavía la presencia de infección *P. carinii*, repetir el ensayo con un inóculo más pesado.

D A T O S D E E F E C T I V I D A D

CENTRO 1^o

223 muestras BAL y IS de pacientes con HIV con síntomas de tracto respiratorio fueron evaluados y comparados con coloración Grocott modificada. Coincidencia global = 90.6%.

De los 21 (9.4%) resultados discrepantes, se obtuvieron después seis muestras, y cinco de los seis resultados fueron positivos en ambas pruebas.

CENTRO 2^o

Fueron evaluadas 135 muestras IS y comparadas con la coloración Grocott. Coincidencia global = 88.9%.

Quince resultados (11.1%) fueron positivos/equívocos en *P. carinii* de Detect IF y negativos en Grocott. Los autores concluyeron que ello indica un aumento en la sensibilidad hacia *P. carinii* en los preparados citológicos de IS con la técnica de inmunofluorescencia, en comparación con las coloraciones convencionales.

CENTRO 3^o

Fueron evaluadas 254 muestras BAL y IS de 75 pacientes con sida y de otros pacientes inmunocomprometidos, incluyendo pacientes de trasplantes y pacientes diagnosticados con 'neumonía atípica', y comparadas con coloración Grocott. Coincidencia global = 94.1%.

Quince resultados(5.9%) fueron positivos/equívocos en *P. carinii* de Detect IF y negativos en Grocott. Los autores concluyeron que la prueba Detect IF era más fiable y sensitiva que la técnica Grocott.

CENTRO 4^o

50 muestras BAL y 50 IS fueron sometidas a pruebas para detectar infección *P. carinii* usando inmunofluorescencia indirecta, inmunofluorescencia directa, coloración Wright-Giemsa modificada y coloración plata modificada. Una muestra positiva fue definida como un frotis que resultó positivo con dos o más métodos.

Usando esta definición, la sensibilidad y especificidad de *P. carinii* de DETECT IF fueron las siguientes.

BAL Sensibilidad = 86% Especificidad = 100%

IS Sensibilidad = 97% Especificidad = 100%

CENTRO 5

152 muestras BAL de pacientes con indicios clínicos de neumonía *P. carinii* pneumonia fueron evaluadas y comparadas con coloración Grocott. Los resultados con cada método fueron comparados con los indicios clínicos de neumonía *P. carinii* (PCP). En cinco casos el resultado de indicios clínicos fue equívoco; cuatro fueron positivos en Detect IF y negativos en Grocott, uno fue positivo en Grocott y negativo en Detect IF.

Coincidencia global de DETECT IF con indicios clínicos de PCP = $\frac{146}{147} = 99.3\%$ (un resultado fue equívoco con IF)

Coincidencia global de coloración Grocott con indicios clínicos de PCP = $\frac{140}{147} = 95.2\%$

Coincidencia global de DETECT IF con Grocott = 94.5%

LIMITACIONES DEL USO

1. El resultado negativo no excluye la posibilidad de infección *P. carinii*. Los resultados deben ser interpretados a la luz de todos los datos clínicos y diagnósticos. Si es necesario, se debe obtener otra muestra.
2. El exceso de mucosa en las muestras puede impedir la coloración adecuada.
3. El anticuerpo anti-ratón conjugado con FITC (fluoresceína-5-isotiocianato) puede presentar reacciones cruzadas con *Candida albicans* cuando ésta se encuentra presente en las muestras de pacientes, lo que puede interpretarse erróneamente como un resultado positivo.¹⁵

Der Detect IF *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) Test ist ein indirekter qualitativer Immunofluoreszenzkit zur Bestimmung von *P. carinii*-Oozysten in menschlicher bronchoalveolärer Spülflüssigkeit und induziertem Sputum. Dieser Test dient als diagnostisches Hilfsmittel bei vermuteter *P. carinii*-Infektion. Die Ergebnisse sind unter Berücksichtigung sämtlicher klinischer und diagnostischer Informationen zu bewerten.

EINLEITUNG

Pneumocystis carinii ist ein eukaryontischer Mikroorganismus unbestimmter Taxonomie. In letzter Zeit durchgeführte ribosomale RNA-Studien ergaben identische Nukleinsäuresequenzen bei manchen Pilzen, es gibt jedoch bisher keine allgemein anerkannte Klassifizierung des Organismus.¹

P. carinii ist ubiquitär, infiziert den Menschen und andere Säugetiere, wobei angenommen wird, dass die Infektion aerogen erfolgt.¹ Dieser Organismus stellt einen bedeutenden Krankheitserreger bei Patienten mit geschwächter Immunabwehr dar, insbesondere bei AIDS,^{2,3} wo er ein nachgewiesener Erreger von Lungeninfektionen ist. Zu den Risikofaktoren einer *P. carinii*-Pneumonieinfektion gehören Unterernährung, hämatologische Malignome, Kollagengefäßstörungen, primäre zelluläre Immundefekt- und Immunsuppressionstherapie, z.B. bei Transplantpatienten oder mit zytotoxischen Medikamenten behandelten Leukämiepatienten.




Die *P. Carinii*-Pneumonie kann scheinbar schnell oder langsam-progredient auftreten. Wenn klinisch evident, wird sie durch erhöhte Atemfrequenz (Atemnot) und hohes Fieber gekennzeichnet. Thoraxaufnahmen zeigen ein diffuses Infiltrat; Lungenfunktionstests ergeben Alveokapillarblock aufgrund beeinträchtigten Gasaustauschs in den Alveolen, wodurch arterielle Hypoxie und Hperkapnie verursacht werden.

Die Diagnose *P. carinii*-Pneumonie wird gegenwärtig aufgrund beobachteter *P. carinii* in Lungenbiopsieproben (offen oder transbronchial), bronchoalveolärer Spülflüssigkeit^{4,5} oder induziertem Sputum gestellt. Sie kann anhand einer Reihe unspezifischer Färbemittel sichtbar gemacht werden, darunter Gomori Methenamin Silber, Toluidin Blau-O, Gram-Weigert, Giemsa und Wright-Giemsa. Da alle dieser Färbemittel mit Hefen und anderen Strukturen reagieren, muss *P. carinii* auf morphologischer Basis kenntlich gemacht werden. Färbeverfahren sind sehr zeitaufwendig und ihre Auswertung erfordert zumeist höchste fachliche Erfahrung. Mittlerweile stehen für *P. carinii*-Oozysten charakteristische monoklonale Antikörper zur Verfügung, die die Entwicklung immunofluoreszenter Verfahren zur schnellen und eindeutigen Feststellung von *P. Carinii*-Oozysten in bronchoalveolären Substanzen^{6,7} und induziertem Sputum^{8,9} ermöglichen. Der Detect IF *P. carinii*-Test setzt einen murinen monoklonalen Antikörper ein, der sowohl mit im Menschen als auch in Nagetieren vorkommenden *P. carinii* reagiert und bietet damit einen schnellen, einfachen Test zur Bestimmung und Identifizierung von *P. carinii* in menschlicher bronchoalveolärer Spülflüssigkeit (BAL) und induziertem Sputum (IS).

TESTPRINZIP

Bronchoalveoläre Spülflüssigkeit- oder vorbehandelte induzierte Sputumproben werden zentrifugiert und gewaschen. Die Pellets werden resuspendiert, auf Objektträger gegeben und gebunden. Die Proben werden enzymatisch aufgelöst. Nach der Inkubation, Spülung, Entfernung überschüssigen Reagens mit saugfähigem Papier und Lufttrocknung werden murine anti-*P. Carinii*-Antikörper und fluoreszent gekennzeichnete Anti-Maus-Antikörper abwechselnd hinzugefügt. Unter einem Fluoreszenzmikroskop erscheinen die Oozysten in mittel- bis starker Grünfärbung mit gleichmäßiger oder ungleichmäßiger Kennzeichnung. Der Nachweis von *P. carinii*-Oozysten in bronchoalveolärer Spülflüssigkeit oder induziertem Sputum zeigt eine *P. Carinii*-Infektion an.

KOMPONENTEN DES KITS

REAG A	Anti-p. Carinii monoklonaler Antikörper	1 × 1 mL	Murine anti-p. Carinii monoklonale Antikörper, Rinderserumalbumin, 0,1 % (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	Xn 
REAG B	Fitc-konjugierter anti-Maus-Antikörper	1 × 1 mL	Fluoreszeinisothiocyanat-konjugierter (fitc) anti-Maus-Antikörper, Evans-Blau-Kontrastfärbung. Gebrauchsfertig.	
REAG C	Enzym (Lyophilisiert)	1 Röhrchen	Vorbehandlungsenzym für klinische Proben. Mit 200 µL 0,001M HCl (mitgeliefert) zu rekonstituieren und vor Gebrauch zu verdünnen.	Xn 
REAG D	Verdünnte Salzsäure (0,001M HCl)	1 × 0,5 mL	Zur Enzymrekonstituierung. Gebrauchsfertig.	
REAG E	Enzymverdünner	1 × 3 mL	Tris-Puffer mit Enzymaktivator. Gebrauchsfertig.	
SPCM SLD	Patientenproben	25 Objektträger	PTFE-überzogene (gelbe) Objektträger mit vier quadratischen Probenvertiefungen.	
REAG F	Fixiermittel	2 × 3 mL	Phosphatgepuffertes Glycerin, Citifluor-photobleichender Hemmer. Gebrauchsfertig.	

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Gebrauchs- und Verfahrensvorschriften

1. Kitkomponenten bitte bei 2-8°C aufbewahren und vor dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden. Abgelaufene Reagenzien nicht mehr verwenden.
2. Verschiedene Kits nicht kombinieren/mischen.
3. Kits nicht einfrieren.
4. Das lyophilisierte Enzym muss vor Gebrauch rekonstituiert werden, siehe Abschnitt Testvorbereitung. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
5. Nach Rekonstituierung mit 200 µL 0,001M HCl und sofern bei 2-8°C gelagert, ist das lyophilisierte Enzym bis zu 3 Monate ab Datum der Rekonstituierung stabil.
6. Fixiermittel vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt lagern. Bei 2-8°C oder 18-25°C aufbewahren.
7. Patientenproben können bei 18-25°C gelagert werden.
8. Im Enzymverdünner kann sich Kondensat bilden. In diesem Fall Kondensat nicht auflösen, da es keinerlei nachteilige Auswirkung auf die Testwirksamkeit hat.
9. Reagenzien vor Kontaminierung schützen. Für jedes Reagens und jede Probe ist jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze zu verwenden.

Gewinnung, Lagerung und Vorbereitung der Proben

Dieser Test ist für Proben menschlicher bronchoalveolärer Lavage und induzierten Sputums geeignet. Es wird empfohlen, bis zu 30 mL bronchoalveoläre Lavage und 2-4 mL induziertes Sputum unter Einsatz geeigneter Verfahren in sterilen Behältern zu sammeln und sobald wie möglich zu testen. Zur Inaktivierung eventuell vorhandener HIV wird dringend empfohlen, die Suspension klinischer Proben vor ihrer Verarbeitung zu gleichen Teilen mit absolutem Äthanol zu verdünnen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) zu inkubieren. Abfallmaterialien sind gemäß vor Ort geltenden Bestimmungen zu entsorgen.

Sputumproben sind vorzubehandeln (durch Homogenisierung oder Inkubation), indem "Sputasol", "Sputolysin" oder ein ähnliches Mukolytikum vor Testbeginn 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) hinzugegeben wird.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zur *in vitro* diagnostischen Verwendung.

Sicherheitsmaßnahmen

1. Die in dieser Druckschrift enthaltenen Anweisungen sind genauestens zu befolgen, insbesondere was den Umgang mit und die Lagerung von Kit-Reagenzien und klinischen Proben anbelangt.
2. Alle Patientenproben sind als potenziell infektiös anzusehen und unter Beachtung sämtlicher Vorsichtsmaßnahmen für den Umgang mit biogefährlichen Substanzen zu behandeln. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5. Januar, 2007, erläutert den sicheren Umgang mit derartigen Materialien gemäß den Regeln guter Laborpraxis.¹⁴
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.

4. Während des Umgangs mit Kit und Proben darf weder geraucht, gegessen, getrunken noch sich geschminkt werden.
5. Bei Hautkrankheiten, Schnittwunden, Abschürfungen oder anderen Hautverletzungen muss geeigneter Schutz getragen werden.
6. Der Anti-*P. carinii*-Antikörper und das FITC-Konjugat enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferarmaturen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden kann. Bei der Entsorgung mit reichlich Wasser spülen, um Azidbildung zu verhindern.
7. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Kit enthaltenen gefährlichen Komponenten sind auf Anforderung von Axis-Shield Diagnostics erhältlich.



A ANTIKÖRPER
Mindergiftig



C ENZYM
Mindergiftig

R22: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
 S23: Rauch nicht einatmen
 S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
 S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

R42: Sensibilisierung durch Einatmen möglich
 S22: Staub nicht einatmen
 S29/35: Nicht in die Kanalisation gelangen lassen; Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
 S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
 S45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
 S63: Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen

V O R B E R E I T U N G

Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel (nicht im Kit enthalten)

1. Präzisionspipetten für 5 µL, 15 µL, 20 µL und 200 µL.
2. Zentrifuge für Mengen von bis zu circa 30 mL bei 3.000 x g.
3. Destilliertes/ultrareines Wasser.
4. Waschflasche mit destilliertem/ultrareinem Wasser.
5. Analar- oder gleichwertiges Azeton.
6. Analar- oder gleichwertiger Absolutäthanol.
7. Inkubator bei 37°C.
8. Befeuchtete Inkubationskammer für Objektträger bei 37°C.
9. Mikroskop-Deckgläschen, 18 x 18 mm and 50 x 20 mm.
10. Zur Prüfung von Fluoreszein und Evans-Blau-Fluoreszenz geeignetes UV-Mikroskop.
11. Zytospin (z.B. Zytospin 2), optional.
12. 5 bis 30 Minuten-Timer.
13. Saugfähiges Papier o.ä. Material.
14. Geeignetes Mukolytikum für induzierte Sputumproben, z.B. Sputolysin (Behring Diagnostic) oder Sputasol (Oxoid). Wie vom Hersteller empfohlen verwenden; oder 0,1 % Dithiothreitollösung (w/v) im Verhältnis 1:1 mit Probe mischen und bei 37°C so lange wie erforderlich inkubieren.
 N.B. Dithiothreitol kann Haut- und Augenreizungen verursachen. Bei Kontakt mit Haut oder Augen mindestens 10 Minuten lang mit Wasser spülen. Bei Beschwerden ärztliche Hilfe aufsuchen.
15. Phosphatgepufferte Salzlösung.

Testvorbereitung

Alle Reagenzien vor Testbeginn auf Raumtemperatur bringen.

Lyophilisiertes Enzym mit 200 µL 0,001M HCl rekonstituieren; dies ergibt 10faches Konzentrat. Rekonstituierungsdatum auf dem Etikett festhalten und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur ruhen (18-25°C) lassen. Vorsichtig vermischen, dabei sicherstellen, dass sich sämtliches Partikelmaterial in der Lösung befindet. Das rekonstituierte Enzym ist bei Temperaturen von 2-8°C 3 Monate lang stabil.

TESTPROTOKOLL

Probenvorbereitung

Patientenproben sind sobald wie möglich nach Entnahme zu testen. Bei der Durchführung des Tests ist der potenzielle HIV-Status der Proben zu beachten und allen entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen Folge zu leisten.

Induzierte Sputumproben sind mit einem Mukolytikum wie z.B. Sputasol vorzubehandeln. Nichtmuköse Proben wie BAL erfordern im Normalfall kein mukolytisches Verfahren.

Protokoll

1. Proben bei 3.000 x g 15 Minuten lang zentrifugieren und Partikel/Pelletmaterial in destilliertem/ultrareinem Wasser waschen. Ein- bis zweimal wiederholen, zwischen den Waschgängen sicherstellen, dass Pellet vollständig neu aufgeschwemmt wird.
2. Letztes Pellet in geringer Menge destillierten/ultrareinen Wassers erneut suspendieren, so dass keine übermäßige Materialdichte vorliegt und mixen.
3. 10-20 µL über gesamte Fläche einer oder mehrerer Objektträgervertiefungen für Patientproben verteilen. Bei 37°C trocknen. Ist ein Zytospin (z.B. Zytospin 2) verfügbar, 0,4 bis 0,5 mL BAL oder IS bei 900 rpm schleudern, dabei einen weißen und einen dunkelgelben Filter verwenden.
4. Proben mit 1-2 Tropfen Analar- (oder gleichwertigem) Azeton binden. Bei Raumtemperatur verdunsten lassen.
5. **Zytospin-Präparate mit destilliertem/ultrareinem Wasser abspülen, um Salze von den Proben zu entfernen, da diese die Wirksamkeit der Enzymauflösung verringern.**
6. Objektträger lufttrocknen.
7. Rekonstituiertes Enzym **1 zu 10 (1+9) mit Enzymverdünner verdünnen.** Jeweils nur unmittelbar erforderliche Menge rekonstituierten Enzyms verdünnen.
8. Getrocknete und gebundene Proben mit **20 µL** verdünntem Enzym belegen. Sicherstellen, dass der gesamte Vertiefungsbereich vom Reagens bedeckt ist.
9. Objektträger GENAU 30 Minuten lang in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubieren. Wird länger als 30 Minuten inkubiert, kommt es zu einer Überdigerierung der Oozysten. Oozysten können dadurch weniger deutlich charakterisiert und weniger leicht identifiziert werden.
10. Objektträger, d.h. die Oberflächen der Vertiefungen mit destilliertem/ultrareinem Wasser abspülen. Wasserstrahl nicht direkt auf Proben richten.
11. Überschüssiges Reagens mit saugfähigem Papier entfernen und Objektträger lufttrocknen.
12. Den Proben **15 µL** Anti-*P. carinii*-Antikörper hinzufügen. Sicherstellen, dass der gesamte Vertiefungsbereich vom Reagens bedeckt ist. 15 Minuten in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubieren.
13. Vertiefungen wie in Schritt 10 beschrieben abspülen, überschüssiges Reagens mit saugfähigem Papier entfernen und lufttrocknen.
14. Den Proben **15 µL** FITC-konjugierte Anti-Maus-Antikörper beifügen. Sicherstellen, dass der gesamte Vertiefungsbereich vom Reagens bedeckt ist. 15 Minuten in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubieren.
15. Vertiefungen abspülen, überschüssiges Reagens mit saugfähigem Papier entfernen und lufttrocknen.
16. Einen Tropfen Fixiermittel auf jede Vertiefung geben und ein passendes Deckgläschen aufsetzen. Objektträger auf saugfähigem Papier wenden und vorsichtig andrücken, um überschüssiges Fixiermittel und Luftbläschen zu entfernen.
17. Proben auf Oozysten mittel- bis tiefgrüner Farbe mit gleichmäßiger oder ungleichmäßiger Kennzeichnung untersuchen. Zellabfälle und anderes Material können mit Evans-Blau, das rot fluoresziert, kontrastgefärbt werden. Den gesamten Probenbereich untersuchen.

TESTAUSWERTUNG

POSITIVES ERGEBNIS – Fünf oder mehr fluoreszente Oozysten auf dem ganzen Objektträger.

UNBESTIMMTES ERGEBNIS – Ein bis fünf fluoreszente Oozysten.

NEGATIVES ERGEBNIS – Keine fluoreszenten Oozysten. Wird dennoch eine *P. carinii*-Infektion vermutete, Test mit schwererem Inokulum wiederholen.

TESTDATEN

CENTRE 1¹⁰

223 BAL- und IS-Proben von HIV-Patienten mit Atemwegssymptomen wurden bewertet und mit modifizierter Grocott-Färbung verglichen. Gesamtübereinstimmung = 90,6 %.

Von 21 (9,4 %) abweichenden Ergebnissen wurden sechs Folgeproben entnommen, wobei fünf von sechs Ergebnissen in beiden Tests positiv ausfielen.

CENTRE 2⁸

135 IS-Proben wurden bewertet und mit der Grocott-Färbung verglichen. Gesamtübereinstimmung = 88,9 %.

Fünfzehn Ergebnisse (11,1 %) waren Detect IF *P. Carinii*-positiv/unbestimmt und Grocott-negativ. Die Autoren schlossen daraus auf eine erhöhte Sensitivität für *P. carinii* in zytologischen IS-Präparaten bei der Anwendung des immunofluoreszenten Verfahrens im Vergleich zu herkömmlichen Färbemitteln.

CENTRE 3⁹

254 BAL- und IS-Proben von 75 AIDS-Patienten, Patienten mit geschwächter Immunabwehr einschließlich Transplantatpatienten sowie Patienten mit 'atypischer Pneumonie' wurden bewertet und mit der Grocott-Färbung verglichen. Gesamtübereinstimmung = 94,1 %.

Fünfzehn Ergebnisse (5,9 %) waren Detect IF *P. Carinii*-positiv/unbestimmt und Grocott-negativ. Schlussfolgerung der Autoren: der Detect IF-Test ist zuverlässiger und sensitiver als das Grocott-Verfahren.

CENTRE 4⁶

50 BAL- und 50 IS-Proben wurden unter Verwendung indirekter Immunofluoreszenz, direkter Immunofluoreszenz, modifizierter Wright-Giemsa-Färbung und modifizierter Silberfärbung auf *P. carinii*-Infektion getestet. Jede Probe, die in zwei oder mehr Verfahren positiv bewertet wurde, wurde als insgesamt positiv angesehen.

Dieser Definition entsprechend lauteten die Sensitivitäts- und Spezifitätswerte von DETECT IF *P. carinii* wie folgt.

BAL Sensitivität = 86 % Spezifität = 100 %

IS Sensitivität = 97 % Spezifität = 100 %

CENTRE 5

152 BAL-Proben von Patienten mit klinisch evidenter *P. carinii*-Pneumonie wurden bewertet und mit der Grocott-Färbung verglichen. Die Ergebnisse jedes Verfahrens wurden mit der klinischen Evidenz von *P. carinii* pneumonia (PCP) verglichen. In fünf Fällen fiel das klinische Evidenzergebnis unbestimmt aus, vier waren Detect IF-positiv und Grocott-negativ, eines war Grocott-positiv und Detect IF-negativ.

Insgesamte Übereinstimmung von DETECT IF mit klinischer Evidenz von PCP = $\frac{146}{147}$ 99,3 % (ein Ergebnis unbestimmt mit IF)

Insgesamte Übereinstimmung von Grocott-Färbung mit klinischer Evidenz von PCP = $\frac{140}{147}$ = 95,2 %

Insgesamte Übereinstimmung von DETECT IF mit Grocott = 94,5 %

GRENZEN DES VERFAHRENS

1. Die Möglichkeit einer *P. carinii*-Infektion ist auch bei negativem Ergebnis weiterhin gegeben. Die Ergebnisse sind unter Berücksichtigung sämtlicher klinischer und diagnostischer Informationen zu bewerten. Wenn erforderlich, ist eine weitere Probe abzunehmen.
2. Übermäßiger Schleimgehalt in Proben kann die Färbung beeinträchtigen.
3. Der FITC-gepaarte Anti-Maus-Antikörper besitzt das Potenzial zur Kreuzreaktion mit in Patientenproben vorhandenem *Candida albicans*, was als falsch-positive Ergebnisse fehlinterpretiert werden kann.¹⁵

Il test Detect IF *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) consta di un kit di immunofluorescenza indiretta qualitativa per la rivelazione di oocisti di *P. carinii* nel liquido del lavaggio broncoalveolare e nell'escreato indotto umani. È indicato quale mezzo diagnostico adiuvante nei casi di sospetta infezione da *P. carinii*. I risultati vanno interpretati alla luce di tutti i dati clinici e diagnostici.

INTRODUZIONE

Pneumocystis carinii è un microrganismo eucariotico di incerta tassonomia. Recenti studi di omologia sull'RNA ribosomiale hanno dimostrato identiche sequenze di acido nucleico con alcuni funghi, anche se la classificazione dell'organismo è tuttora oggetto di dibattito.¹

P. carinii è un microrganismo ubiquitario, che infetta l'uomo e gli altri mammiferi; si suppone che l'infezione sia veicolata dall'aria.¹ È un patogeno importante nei soggetti immunocompromessi, in particolare nei pazienti affetti da AIDS^{2,3}, nei quali è causa accertata di infezione polmonare. I fattori che sembrano aumentare la possibilità di insorgenza di pneumocistosi sono: malnutrizione, neoplasie ematologiche, malattie vascolari del collagene, immunodeficienza cellulare primaria e terapia immunosoppressiva, ad esempio nei pazienti trapiantati e leucemici sottoposti a terapia citotossica.




La pneumocistosi può avere esordio apparentemente rapido oppure insidioso. Nei casi in cui è clinicamente evidente, i sintomi sono un'aumentata frequenza respiratoria e picchi di febbre. Le lastre del torace mostrano un infiltrato diffuso; i test di funzionalità polmonare evidenziano blocco alveolo-capillare, che porta a compromissione dello scambio gassoso a livello alveolare, con conseguente ipossiemia e ipercapnia.

Al momento attuale, una diagnosi di pneumocistosi può essere ottenuta mediante la rivelazione di *P. carinii* nel materiale prelevato mediante biopsia polmonare transbronchiale o a cielo aperto, nel lavaggio broncoalveolare^{4,5} o nell'escreato indotto. Può essere visualizzato mediante svariate colorazioni aspecifiche, tra cui argento-metenamina secondo Gomori, blu di toluidina O, Gram-Weigart, Giemsa e Wright-Giemsa. Dato che tutte queste colorazioni reagiscono con i lieviti e altre strutture, *P. carinii* viene differenziato sulla base della sua morfologia. Le tecniche di colorazione richiedono molto tempo e, spesso, un elevato livello di esperienza nell'interpretazione dei risultati. La disponibilità di anticorpi monoclonali specifici per le oocisti di *P. carinii* ha consentito lo sviluppo di metodiche di immunofluorescenza, capaci di identificare rapidamente e inequivocabilmente le oocisti di *P. carinii* nel materiale broncoalveolare^{6,7} e nell'escreato indotto.^{8,9} Il test Detect IF *P. carinii* utilizza un anticorpo monoclonale murino, che reagisce verso il *P. carinii* umano e dei roditori, in un test semplice e rapido per la rivelazione e l'identificazione di *P. carinii* nel liquido del lavaggio broncoalveolare (BAL) ed escreato indotto (IS).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I campioni di liquido del lavaggio broncoalveolare o di escreato indotto pretrattato vengono centrifugati e lavati. I pellet vengono quindi risospesi, depositati su vetrini ed infine fissati. I campioni vengono digeriti dagli enzimi. Dopo la fase di incubazione, risciacquo, asciugatura con materiale assorbente e asciugatura all'aria, si aggiungono, a turno, l'anticorpo murino anti-*P. carinii* e l'anticorpo antimurino marcato per fluorescenza. Al microscopio a fluorescenza, le oocisti sono di colore verde-mela da medio brillante a brillante e possono essere uniformemente o irregolarmente marcate. La presenza di oocisti di *P. carinii* nel liquido del lavaggio broncoalveolare o nell'escreato indotto indica infezione da *P. carinii*.

C O M P O N E N T I D E L K I T

REAG A	Anticorpo monoclonale anti- <i>P. carinii</i>	1 × 1 mL	Anticorpo monoclonale murino anti- <i>P. carinii</i> , siero albumina bovina, 0,1% (p/v) sodio azide. Pronto per l'uso.	Xn 
REAG B	Anticorpo antimurino coniugato con FITC	1 × 1 mL	Anticorpo antimurino coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC), controcolorante blu Evans. Pronto per l'uso.	
REAG C	Enzima (Liofilizzato)	1 flaconcino	Enzima per il pretrattamento dei campioni clinici. Ricostituire con 200 µL di HCl 0,001M (fornito) e diluire prima dell'uso.	Xn 
REAG D	Acido cloridrico diluito (HCl 0,001M)	1 × 0,5 mL	Per la ricostituzione dell'enzima. Pronto per l'uso.	
REAG E	Diluyente di enzimi	1 × 3 mL	Tampone Tris con attivatore enzimatico. Pronto per l'uso.	
SPCM SLD	Vetrini per campioni	25 vetrini	Vetrini (gialli) rivestiti in PTFE con quattro pozzetti quadrati.	
REAG F	Mezzo di montaggio	2 × 3 mL	Glicerolo tamponato con fosfato, ritardante fotodecolorante Citifluor. Pronto per l'uso.	

C O N S E R V A Z I O N E D E I R E A G E N T I

Note sulla manipolazione e sulla procedura

1. Conservare i componenti del kit a temperature comprese tra 2°C e 8°C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare i reagenti scaduti.
2. Non mescolare tra loro kit diversi.
3. Non congelare i kit.
4. Ricostituire l'enzima liofilizzato prima dell'uso; si rinvia alla sezione Preparazione del dosaggio. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Dopo la ricostituzione con 200 µL di HCl 0,001M, l'enzima liofilizzato è stabile fino a 3 mesi dalla data di ricostituzione, se conservato a temperature di 2-8°C.
6. Conservare il mezzo di montaggio senza esporlo alla luce. Conservare a 2-8°C o a 18-25°C.
7. I vetrini per campioni possono essere conservati a temperature di 18-25°C.
8. È possibile la formazione di un precipitato nel diluyente enzimatico; in tale evenienza, non cercare di dissolverlo nuovamente, in quanto l'efficacia del test non è influenzata negativamente dal precipitato.
9. Evitare di contaminare i reagenti. Per ciascun reagente o a ogni manipolazione dei campioni, utilizzare un nuovo puntale per le pipette.

Raccolta, conservazione e pretrattamento dei campioni

Il dosaggio è indicato per l'uso con campioni di lavaggio broncoalveolare e di escreto indotto umani. Si dovrebbero raccogliere fino a 30 mL di lavaggio broncoalveolare e 2-4 mL di escreto indotto in contenitori sterili, seguendo procedure appropriate; testare i campioni al più presto dopo averli raccolti. Per inattivare virus dell'immunodeficienza umana eventualmente presenti, si consiglia caldamente di diluire la sospensione del materiale clinico con un volume equivalente di etanolo assoluto e di incubare per dieci minuti a temperatura ambiente (18-25°C) prima del trattamento. Smaltire i materiali di rifiuto in conformità alle norme locali.

Prima di eseguire il test, pretrattare campioni di escreto (omogeneizzazione o incubazione) aggiungendo "Sputasol", "Sputolysin" o mucolitici simili per dieci minuti a temperatura ambiente (18-25°C).

A V V E R T E N Z E E P R E C A U Z I O N I

Per solo uso diagnostico in vitro.

Precauzioni di sicurezza

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione dei reagenti del kit e dei campioni clinici.
2. Tutti i campioni dei pazienti vanno considerati come potenzialmente infetti e, pertanto, vanno manipolati osservando le stesse precauzioni adottate per altri materiali potenzialmente biopercicolosi. Nel manuale

CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5ª edizione, 2007, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio.¹⁴

3. Non pipettare con la bocca.
4. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
6. L'anticorpo anti-*P. carinii* e il coniugato FITC contengono azide sodica, che reagisce con tubature in piombo e rame, formando azidi metalliche altamente esplosive. Smaltire negli scarichi con acqua abbondante per evitare l'accumulo di azide.
7. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Axis-Shield Diagnostics.



A ANTICORPO
Nocivo



C ENZIMA
Nocivo

R22: Nocivo per ingestione

S23: Non respirare I fumi

S29/35: Non gettare I residui nelle fognature; non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia

R42: Può provocare sensibilizzazione per inalazione

S22: Non respirare le polveri

S29/35: Non gettare I residui nelle fognature; non disfarsi del prodotto e del recipiente se non con le dovute precauzioni

S36/37/39: Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia

S45: In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta)

S63: In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo

P R E P A R A Z I O N E

Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti

1. Pipette di precisione per dispensare 5 µL, 15 µL, 20 µL e 200 µL.
2. Centrifuga per volumi fino a circa 30 mL a 3.000 x g.
3. Acqua distillata/ultrapura.
4. Flacone di lavaggio contenente acqua distillata/ultrapura.
5. Acetone Analar o di grado equivalente.
6. Etanolo assoluto Analar o di grado equivalente.
7. Incubatore a 37°C.
8. Camera di incubazione per vetrini umidificata a 37°C.
9. Coprivetrini per microscopio, 18 x 18 mm e 50 x 20 mm.
10. Microscopio UV, attrezzato per visualizzare la fluoresceina o fluorescenza blu Evans.
11. Citocentrifuga (ad es. Cytospin 2), opzionale.
12. Timer per 5 - 30 minuti.
13. Materiale/carta assorbente.
14. Mucolitico appropriato per i campioni di escreato indotto, ad es. Sputolysin (Behring Diagnostic) o Sputasol (Oxoid). Utilizzare come raccomandato dal produttore, oppure utilizzare una soluzione di ditiotreitolo 0,1% (p/v) in rapporto 1:1 con il volume del campione ed incubare a 37°C per il tutto il tempo richiesto. N.B. Il ditiotreitolo può irritare occhi e cute. Se viene a contatto con gli occhi o la cute, irrigare con acqua per almeno 10 minuti. In caso di fastidio, rivolgersi al medico.
15. Soluzione salina tamponata con fosfato.

Preparazione del dosaggio

Riequilibrare i reagenti a temperatura ambiente.

Ricostituire l'enzima liofilizzato con 200 µL di HCl 0,001M; si otterrà un concentrato di 10 volte. Annotare la data di ricostituzione sull'etichetta e lasciare a temperatura ambiente (18°-25°C) per dieci minuti. Miscelare delicatamente per inversione, verificando che tutto il materiale particolato sia nella soluzione. L'enzima ricostituito è stabile per 3 mesi a temperature di 2-8°C.

PROTOCOLLO PER IL DOSAGGIO

Pretrattamento dei campioni

I campioni dei pazienti devono essere testati al più presto dopo averli raccolti. Durante l'esecuzione di un dosaggio, l'operatore deve essere consapevole del potenziale stato HIV dei campioni, per cui si raccomanda di prendere tutte le precauzioni necessarie nella manipolazione dei campioni.

I campioni di escreato indotto vanno pretrattati con un mucolitico, ad es. Sputasol. I campioni non mucoidi, quali i BAL, non richiedono, di regola, una procedura mucolitica.

Protocollo

1. Centrifugare i campioni per 15 minuti a 3.000 x g, quindi lavare il materiale particolato/pellettabile in acqua distillata/ultrapura. Ripetere una o due volte, per verificare che il pellet sia completamente risospeso tra i lavaggi.
2. Risospendere il pellet finale in una piccola quantità di acqua distillata/ultrapura, di modo che la densità del materiale non sia eccessiva, quindi agitare con il Vortex.
3. Depositare 10-20 µL sull'intera superficie di uno o più pozzetti di vetrini. Evaporare a secco a 37°C. Se è disponibile una citocentrifuga (ad es. Cytospin 2), centrifugare 0,4 – 0,5 mL di BAL o IS a 900 rpm, utilizzando un filtro bianco ed uno marrone chiaro.
4. Fissare i campioni, depositando 1-2 gocce di acetone Analar (o di qualità equivalente). Lasciar evaporare a temperatura ambiente.
5. **Sciacquare i preparati centrifugati, facendo scorrere dell'acqua distillata/ultrapura per rimuovere i sali dai campioni, poiché essi riducono l'efficacia della digestione enzimatica.**
6. Asciugare i vetrini all'aria.
7. **Diluire 1 a 10 (1+9) l'enzima ricostituito con il diluente per enzimi.** Diluire solo la quantità di enzima ricostituito sufficiente per i requisiti immediati.
8. Depositare **20 µL** di enzima diluito sui campioni asciutti e fissati, verificando che l'intera superficie del pozzetto sia coperta dal reagente.
9. Incubare i vetrini per 30 minuti **ESATTAMENTE** in una camera umidificata, impostata a 37°C. Un periodo di incubazione superiore ai 30 minuti comporta la digestione eccessiva delle oocisti, che possono presentare caratteristiche meno evidenti e, pertanto, possono essere meno facilmente identificabili.
10. Sciacquare i vetrini con acqua distillata/ultrapura facendo scorrere dell'acqua sopra la superficie dei pozzetti. Non lavare i pozzetti con un getto diretto di acqua.
11. Asciugare i vetrini dapprima con carta assorbente e quindi all'aria.
12. Aggiungere ai campioni **15 µL** di anticorpo anti-*P. carinii*, verificando che l'intera superficie del pozzetto sia coperta dal reagente. Incubare in una camera umidificata per 15 minuti a 37°C.
13. Sciacquare i pozzetti come descritto al punto 10; asciugare dapprima con carta assorbente e quindi all'aria.
14. Aggiungere ai campioni **15 µL** di anticorpo antimurino coniugato con FITC, verificando che l'intera superficie del pozzetto sia coperta dal reagente. Incubare in una camera umidificata per 15 minuti a 37°C.
15. Sciacquare i pozzetti, asciugare dapprima con carta assorbente e quindi all'aria.
16. Depositare una goccia di mezzo di montaggio su ogni pozzetto utilizzato, quindi coprire con un coprivetrino di misura adatta. Capovolgere il vetrino su carta assorbente e premere delicatamente per assorbire l'eccesso di mezzo di montaggio ed evitare la formazione di bollicine d'aria.
17. Esaminare i campioni per verificare la presenza di oocisti di colore verde-mela da brillante a medio brillante, che possono essere marcate uniformemente o irregolarmente. I detriti cellulari e altro materiale possono essere controcolorati in blu Evans, che dà una colorazione rossa. Esaminare l'intera superficie dei campioni.

O teste Detect IF *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) é um conjunto de imunofluorescência indirecta qualitativa para detecção de oocistos de *P. carinii* em amostras humanas de líquido de lavagem broncoalveolar e de expectoração induzida. Destina-se a ser utilizado como auxiliar de diagnóstico em caso de suspeita de infecção por *P. carinii*. Os resultados devem ser interpretados à luz de toda a informação clínica e de diagnóstico.

INTRODUÇÃO

Pneumocystis carinii é um microrganismo eucariótico cuja taxonomia não se encontra bem estabelecida. Estudos recentes da homologia do ARN ribossomal mostraram sequências de ácidos nucleicos idênticas às de alguns fungos, mas a classificação deste organismo continua a ser alvo de discussão.¹

P. carinii é ubíquo e infecta o homem e outros mamíferos; pensa-se que a via de infecção seja aérea.¹ É um dos principais agentes patogénicos que afectam doentes imunocomprometidos, especialmente doentes com SIDA^{2,3}, nos quais provoca infecção pulmonar. A inanição, as patologias hematológicas de natureza oncológica, as doenças do colagénio vascular, as deficiências primárias da imunidade celular e as terapêuticas imunossupressoras por exemplo, em doentes submetidos a transplantes e em doentes com leucemia aos quais são administrados fármacos citotóxicos são factores que aumentam a probabilidade de pneumonia causada por *P. carinii*.




O desencadear da pneumonia por *P. carinii* pode ser aparentemente rápida ou ocorrer de forma insidiosa. Quando se manifesta clinicamente, caracteriza-se por aumento da frequência respiratória e febre elevada. As radiografias do tórax evidenciam um infiltrado difuso; os testes da função pulmonar revelam bloqueio alvéolo-capilar resultante da dificuldade das trocas gasosas ao nível dos alvéolos, com consequente hipoxemia e hipercapnia.

Actualmente, é possível diagnosticar a pneumonia causada por *P. carinii* através da presença deste microrganismo em material obtido por biopsia de pulmão aberto ou transbrônquica, lavagem broncoalveolar^{4,5} ou expectoração induzida. O organismo pode ser visualizado utilizando diversas colorações não específicas, incluindo prata-metamina de Gomori, azul de toluidina-O, Gram-Weigert, Giemsa e Wright-Giemsa. Dado que estas colorações reagem com fungos e com outras estruturas, a identificação de *P. carinii* tem de ser feita com base na morfologia. As técnicas de coloração são morosas e a interpretação dos resultados requer, frequentemente, elevada perícia técnica. Já se encontram disponíveis anticorpos monoclonais específicos para oocistos de *P. carinii*, os quais permitem desenvolver técnicas imunofluorescentes para identificar, rapidamente e de forma inequívoca, oocistos de *P. carinii* em material broncoalveolar^{6,7} e em expectoração induzida.^{8,9} O teste Detect IF *P. carinii* utiliza um anticorpo monoclonal de origem murina que reage com as formas de *P. carinii* presentes no homem e em roedores, num teste simples e rápido para detecção e identificação de *P. carinii* em líquido de lavagem broncoalveolar (LBA) de origem humana e expectoração induzida (EI).

PRINCÍPIO DO ENSAIO

As amostras de líquido de lavagem broncoalveolar ou expectoração induzida previamente tratada são centrifugadas e lavadas. Os sedimentos são ressuspensos, colocados em lâminas e fixados. As amostras são submetidas a digestão enzimática. O anticorpo murino contra *P. carinii* e o anticorpo anti-ratinho marcado com fluorescência são adicionados alternadamente após os diferentes passos de incubação, enxaguamento, secagem com papel absorvente e secagem ao ar. Observados em microscopia de fluorescência, os oocistos apresentam cor verde-maçã semibrilhante a brilhante e podem estar marcados de modo uniforme ou heterogéneo. A presença de oocistos de *P. carinii* em líquido de lavagem broncoalveolar ou expectoração induzida indica infecção por *P. carinii*.

COMPONENTES DO CONJUNTO

REAG A	Anticorpo monoclonal contra <i>P. carinii</i>	1 × 1 mL	Anticorpo monoclonal de murino contra <i>P. carinii</i> , albumina de soro de bovino, azida sódica a 0,1% (p/v). Pronto a utilizar.	Xn 
REAG B	Anticorpo anti-ratinho conjugado com FITC	1 × 1 mL	Anticorpo anti-ratinho conjugado com fluoresceína-isotiocianato (FITC), corante de contraste Evans Blue). Pronto a utilizar.	
REAG C	Enzima (Liofilizada)	1 frasco	Enzima para pré-tratamento de amostras clínicas. Reconstituir com 200 µL de HCl 0,001 M (fornecido) e diluir antes de utilizar.	Xn 
REAG D	Ácido Hidroclórico diluído (HCl 0,001 M)	1 × 0,5 mL	Para reconstituição da Enzima. Pronto a utilizar.	
REAG E	Diluyente da enzima	1 × 3 mL	Tampão Tris com activador da enzima. Pronto a utilizar.	
SPCM SLD	Lâminas de amostras dos doentes	25 lâminas	Lâminas (amarelas) revestidas com PTFE, com quatro poços de amostras quadrados.	
REAG F	Meio de montagem	2 × 3 mL	Glicerol tamponado com fosfato, retardante de descoloração Citifluor. Pronto a utilizar.	

ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

Notas sobre o Manuseamento e o Procedimento

1. Armazene os componentes do conjunto entre 2 e 8°C e utilize-os até ao fim do prazo de validade indicado nos rótulos. Não utilize reagentes cujo prazo de validade tenha sido ultrapassado.
2. Não misture conjuntos diferentes.
3. Não submeta os conjuntos a congelamento.
4. É necessário reconstituir a Enzima liofilizada antes de utilizar; consulte a secção Preparação do Ensaio. Todos os outros reagentes estão prontos a utilizar.
5. Após reconstituição com 200 µL de HCl 0,001 M, a Enzima liofilizada é estável durante um máximo de 3 meses a partir da data de reconstituição, desde que armazenada entre 2 e 8°C.
6. Não exponha o Meio de Montagem à luz directa durante o armazenamento. Armazene entre 2 e 8°C ou entre 18 e 25°C.
7. As Lâminas de Amostras dos Doentes podem ser guardadas entre 18 e 25°C.
8. Poderá haver formação de precipitado no Diluyente da Enzima. Caso tal ocorra, não procure redissolver, pois não prejudica a eficácia do teste.
9. Evite a contaminação dos reagentes. Utilize uma nova ponta de pipeta descartável para manuseamento de cada reagente ou amostra.

Colheita de Amostras, Armazenamento e Pré-Tratamento

O ensaio destina-se a ser utilizado com amostras humanas de lavagem broncoalveolar e de expectoração induzida. Idealmente, deverá proceder-se à colheita de um máximo de 30 mL de lavado broncoalveolar e de 2 a 4 mL de expectoração induzida para recipientes estéreis, utilizando procedimentos apropriados. As amostras devem ser testadas o mais rapidamente possível após a colheita. Para inactivar quaisquer vírus da imunodeficiência humana eventualmente presente, recomenda-se vivamente que a suspensão de material clínico seja diluída com igual volume de etanol absoluto e incubada durante dez minutos à temperatura ambiente (18-25°C) antes do processamento. Elimine os materiais residuais de acordo com as regulamentações locais.

As amostras de expectoração devem ser previamente tratadas (homogeneização ou incubação) mediante a adição de Sputasol, de Sputolysin ou de um agente mucolítico similar, durante dez minutos à temperatura ambiente (18-25°C), antes do ensaio.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Para utilização exclusiva no diagnóstico *in vitro*.

Precauções de Segurança

1. Siga rigorosamente as instruções deste folheto, em especial no que diz respeito às condições de manuseamento e armazenamento dos reagentes do conjunto e de amostras clínicas.
2. Todas as amostras de doentes devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas adoptando precauções idênticas às utilizadas para qualquer outro material com potenciais riscos biológicos. O Manual de Saúde do CDC/NIH, Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (Segurança Biológica em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos), 5ª edição, 2007, descreve a forma como estes materiais devem ser manuseados de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais.¹⁴
3. Não pipete com a boca.
4. Não fume, não coma, não beba nem aplique cosméticos em áreas de manuseamento dos conjuntos e amostras.
5. Quaisquer lesões dermatológicas, tais como cortes, abrasões e outras lesões da pele, devem ser convenientemente protegidas.
6. O Anticorpo contra *P. carinii* e o Conjugado de FITC contêm azida sódica, a qual pode reagir com o chumbo e o cobre existentes nas redes de canalizações com formação de azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar, lave com grandes quantidades de água para evitar a acumulação de azida.
7. As fichas de segurança de todos os componentes perigosos incluídos neste conjunto podem ser solicitadas à Axis-Shield Diagnostics.



A ANTICORPO

Nocivo

R22: Nocivo em caso de ingestão
S23: Não respirar os vapores
S29/35: Não deitar os resíduos nos esgotos; deitar fora este produto e o seu recipiente com a devida precaução
S36/37/39: Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face, adequados



C ENZIMA

Nocivo

R42: Pode provocar uma sensibilização por inalação
S22: Não respirar as poeiras
S29/35: Não deitar os resíduos nos esgotos; deitar fora este produto e o seu recipiente com a devida precaução
S36/37/39: Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento de protecção para os olhos/face, adequados
S45: Em caso de acidente o de indisposição, consultar imediatamente um médico (mostrar-lhe o rótulo, se possível)
S63: Em caso de inalação acidental, remover a vítima da zona contaminada e mantê-la em repouso

PREPARAÇÃO

Materiais/Equipamento Necessário Mas Não Fornecido

1. Pipetas de precisão para dispensar volumes de 5 µL, 15 µL, 20 µL e 200 µL.
2. Centrífuga para volumes máximos de cerca de 30 mL, a 3000 g.
3. Água destilada/ultrapura.
4. Frasco de lavagem com água destilada/ultrapura.
5. Acetona Analar ou de grau equivalente.
6. Etanol absoluto Analar ou de grau equivalente.
7. Incubadora a 37°C.
8. Câmara húmida para incubação das lâminas a 37°C.
9. Lâminas para microscopia, de 18 x 18 mm e 50 x 20 mm.
10. Microscópio de ultravioleta equipado para visualização da fluorescência emitida pela fluoresceína e pelo corante Evans Blue.
11. Cytospin (por exemplo, Cytospin 2), opcional.
12. Temporizador para 5 a 30 minutos.
13. Material para absorção/toalhetes de papel.

14. Agente mucolítico apropriado para amostras de expectoração induzida, por exemplo, Sputolysin (Behring Diagnostic) ou Sputasol (Oxoid). Utilize conforme recomendado pelo fabricante; como alternativa, utilize solução de Ditiotreitól a 0,1% (p/v) na razão de 1:1 em relação ao volume de amostra e incube a 37°C durante o tempo necessário.
N.B. — O Ditiotreitól pode ser irritante para os olhos e a pele. Caso ocorra contacto com a pele ou os olhos, irrigue com água durante, pelo menos, 10 minutos. Se sentir desconforto, procure assistência médica.
15. Solução salina tamponada com fosfato.

Preparação para o Ensaio

Deixe equilibrar todos os reagentes à temperatura ambiente.

Reconstitua a Enzima liofilizada com 200 µL de HCl 0,001 M; obterá um concentrado de 10 X. Registe a data de reconstituição no rótulo e deixe repousar à temperatura ambiente (18-25°C) durante dez minutos. Misture por inversão suave, procurando dissolver todas as partículas. A enzima reconstituída é estável durante 3 meses entre 2 e 8°C.

P R O T O C O L O D E E N S A I O

Pré-Tratamento das Amostras

As amostras de doentes devem ser testadas o mais rapidamente possível após a colheita. Durante a realização de um ensaio, tenha presente a possibilidade da presença de VIH nas amostras e adote todas as precauções recomendadas para manuseamento deste tipo de amostras.

As amostras de expectoração induzida devem ser previamente tratadas com um agente mucolítico, por exemplo Sputasol. As amostras não mucóides, como as de LBA, não exigem, normalmente, o procedimento mucolítico.

Protocolo

1. Centrifugue as amostras durante 15 minutos, a 3000 g, e lave o material que se encontra sob a forma de partículas/sedimento com água destilada/ultrapura. Repita uma ou duas vezes, procurando que o sedimento seja totalmente ressuspenso entre as lavagens.
2. Ressuspenda o sedimento final num pequeno volume de água destilada/ultrapura, para que a densidade do material não seja excessiva, e agite no Vortex.
3. Espalhe 10 a 20 µL sobre a totalidade da área de um ou mais poços das Lâminas de Amostras dos Doentes. Evapore até à secura, a 37°C. Caso disponha de uma citocentrífuga Cytospin (por exemplo, Cytospin 2), centrifugue 0,4 a 0,5 mL de LBA ou de EI a 900 rpm, utilizando um filtro branco e um filtro amarelo-acastanhado.
4. Fixe as amostras, cobrindo-as com 1 a 2 gotas de acetona Analar (ou de qualidade equivalente). Deixe evaporar à temperatura ambiente.
5. **Lave as preparações Cytospin com um fluxo de destilada/ultrapura para remover sais da amostra, já que estes reduzem a eficácia da digestão enzimática.**
6. Seque as lâminas ao ar.
7. **Dilua a Enzima reconstituída de 1 para 10 (1+9) com o Diluente da Enzima.** Dilua apenas a quantidade de Enzima reconstituída necessária para utilização imediata.
8. Cubra as amostras secas e fixadas com **20 µL** de Enzima diluída. Certifique-se de que o reagente cobre a totalidade da área do poço.
9. Incube as lâminas durante EXACTAMENTE 30 minutos numa câmara húmida, a 37°C. Ocorrerá excesso de digestão dos oocistos, se a incubação ultrapassar os 30 minutos. As características dos oocistos podem alterar-se, dificultando a sua identificação.
10. Lave as lâminas com destilada/ultrapura, assegurando o fluxo da mesma sobre a superfície dos poços. Não dirija o jacto directamente para a amostra.
11. Seque as lâminas com papel absorvente e seque ao ar.
12. Adicione às amostras **15 µL** de Anticorpo contra *P. carinii*. Certifique-se de que o reagente cobre a totalidade da área do poço. Incube numa câmara húmida durante 15 minutos, a 37°C.
13. Lave os poços conforme descrito no passo 10, seque com papel absorvente e seque ao ar.
14. Adicione às amostras **15 µL** de Anticorpo Anti-Ratinho Conjugado com FITC. Certifique-se de que o reagente cobre a totalidade da área do poço. Incube numa câmara húmida durante 15 minutos, a 37°C.
15. Lave os poços, seque com papel absorvente e seque ao ar.

16. Coloque uma gota de Meio de Montagem em cada poço utilizado e aplique uma lamela de tamanho apropriado. Inverta a lâmina sobre um toalhete de papel absorvente e prima suavemente, para eliminar o excesso de Meio de Montagem e as bolhas de ar.
17. Observe as amostras procurando identificar oocistos de cor verde-maçã semibrilhante a brilhante, os quais podem estar marcados de modo uniforme ou heterogéneo. Os restos celulares e outro material podem ser submetidos a uma coloração de contraste com Evans Blue, que apresentará fluorescência vermelha. Observe a totalidade da área da amostra.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

RESULTADO POSITIVO - Cinco ou mais oocistos fluorescentes numa lâmina.

RESULTADO DUVIDOSO - Um a cinco oocistos fluorescentes.

RESULTADO NEGATIVO - Ausência de oocistos fluorescentes. Caso continue a suspeitar de infecção por *P. carinii*, repita o ensaio com maior quantidade de inóculo.

DADOS DE DESEMPENHO

CENTRO 1^o

Analisaram-se 223 amostras de LBA e de EI de doentes com VIH e com sintomas a nível do tracto respiratório e compararam-se os resultados com os obtidos utilizando a coloração de Grocott modificada. Concordância global = 90,6%.

De 21 (9,4%) resultados discrepantes, obtiveram-se subsequentemente seis amostras. Cinco em seis resultados foram positivos em ambos os testes.

CENTRO 2^o

Analisaram-se 135 amostras de EI e compararam-se os resultados com os obtidos pela coloração de Grocott. Concordância global = 88,9%.

Quinze resultados (11,1%) foram positivos/duvidosos com o teste Detect IF *P. carinii* e negativos pela coloração de Grocott. Os autores concluíram que estas observações indicam uma maior sensibilidade da técnica de imunofluorescência à presença de *P. carinii* em preparações citológicas de EI, quando comparada com as colorações convencionais.

CENTRO 3^o

Analisaram-se 254 amostras de LBA e de EI provenientes de 75 doentes com SIDA e de outros doentes imunocomprometidos, incluindo doentes submetidos a transplante, assim como de doentes aos quais foi diagnosticada "pneumonia atípica". Compararam-se os resultados com os obtidos pela coloração de Grocott. Concordância global = 94,1%.

Quinze resultados (5,9%) foram positivos/duvidosos com o teste Detect IF *P. carinii* e negativos pela coloração de Grocott. Os autores concluíram que o teste Detect IF mostrou maior fiabilidade e sensibilidade que a técnica de Grocott.

CENTRO 4^o

Testou-se a existência de infecção por *P. carinii* em 50 amostras de LBA e 50 amostras de EI, utilizando imunofluorescência indirecta, imunofluorescência directa, coloração de Wright-Giemsa modificada e coloração de prata modificada. Definiu-se amostra positiva como qualquer esfregaço que tenha sido positivo por dois ou mais métodos.

Utilizando esta definição, obtiveram-se os seguintes valores de sensibilidade e de especificidade para o teste DETECT IF *P. carinii*:

LBA	Sensibilidade = 86%	Especificidade = 100%
EI	Sensibilidade = 97%	Especificidade = 100%

CENTRO 5

Analisaram-se 152 amostras de LBA de doentes com sinais clínicos de pneumonia causada por *P. carinii* e compararam-se os resultados com os obtidos pela coloração de Grocott. Os resultados obtidos para cada método foram comparados com as observações clínicas de pneumonia por *P. carinii* (PCP). Em cinco casos, o resultado das observações clínicas foi duvidoso; quatro casos foram positivos com o teste Detect IF e negativos pela coloração de Grocott; um foi positivo pela coloração de Grocott e negativo com o teste Detect IF.

Concordância global entre os resultados obtidos com DETECT IF e os sinais clínicos de PCP = $\frac{146}{147} = 99,3\%$ (um resultado foi duvidoso com o teste IF)

Concordância global entre os resultados obtidos com a coloração de Grocott e os sinais clínicos de PCP = $\frac{140}{147} = 95,2\%$

Concordância global entre DETECT IF e Grocott = 94,5%

LIMITAÇÕES DE USO

1. Um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção por *P. carinii*. Os resultados devem ser interpretados à luz de toda a informação clínica e de diagnóstico. Se necessário, obtenha uma nova amostra.
2. O excesso de mucosidade em amostras pode impedir uma coloração adequada.
3. O anticorpo anti-murino conjugado com FITC tem potencial para produzir reacções cruzadas com *Candida albicans*, quando presente nas amostras dos pacientes, o que pode ser erradamente interpretado como resultados falso-positivos.¹⁵

Detect IF *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) testen er et indirekte kvalitativt immunofluorescens kit til opdagelse af *P. carinii* oocyster i human bronchoalveolær udskylningsvæske og induceret sputum. Den er beregnet til at hjælpe til i diagnose om mistænkt *P. carinii* infektion. Resultater bør tolkes på baggrund af alle kliniske og diagnostiske oplysninger.

INDLEDNING

Pneumocystis carinii er en eukaryotisk mikroorganisme af ubestemt taksonomi. Nylige studier i ribosomal RNA homologi har vist identiske nucleinsyresekvenser med noget svamp, men klassifikation af organismen er stadig et emne for diskussion.¹

P. carinii er ubikvitær, idet den smitter både mennesker og dyr; infektionsruten anses for at være luftbåren.¹ Den er et større patogen hos immunsvækkede, specielt hos patienter med AIDS^{2,3} hvor den er en anerkendt årsag for lungeinfektion. Sulttilstand, hæmatologiske maligniteter, kollagenvaskulære sygdomme, primær cellulær immundefekt og immunosuppressiv terapi, for eksempel i transplantationspatienter og leukæmipatienter på cytotoxiske medikamenter, er faktorer der forøger muligheden for infektion med *P. carinii* pneumoni.




Indtræden af *P. carinii* pneumoni kan være enten hurtig eller opstå insidiøst. Kliniske tegn er forøget åndedrætshastighed og svingende temperatur. Lungebilleder viser udbredt infiltration; lungefunktionstest viser alveolær-kapillær blokering på grund af hæmmet gasudveksling i alveoler, der derved forårsager hypoxæmi og hyperkapni.

En diagnose for *P. carinii* pneumoni kan for øjeblikket stilles ved at finde *P. carinii* i enten åben lunge- eller transbronkialt lungebiopsimateriale, bronchoalveolær udskylningsvæske^{4,5} eller induceret sputum. Den kan gøres synligt med en række ubestemte farvninger deriblandt Gomori methenamine silver, toluidine blue-O, Gram-Weigert, Giemsa og Wright-Giemsa. Fordi alle disse farvninger reagerer med gær og andre strukturer, skal *P. carinii* skelnes ved hjælp af morfologi. Farvningsteknik er tidskrævende og nødvendiggør tit et højt niveau af teknisk ekspertise for tolkning af resultater. Monoklonale antistoffer, der er specifikke for *P. carinii* oocyster, er nu tilgængelige, så udvikling af immunofluorescerende teknik for hurtig og entydig identificering af *P. carinii* oocyster i bronchoalveolært materiale^{6,7} og induceret sputum^{8,9} kan foretages. Detect IF *P. carinii* tests bruger et murin-monoklonalt antistof reaktiv for både menneske- og gnaver *P. carinii* i en enkel og hurtig test for opdagelse og identifikation af *P. carinii* i human bronchoalveolær udskyldningsvæske (BAL) og induceret sputum (IS).

ANALYSEPRINCIP

Prøver af bronchoalveolær udskylningsvæske eller forbehandlet induceret sputum centrifugeres og vaskes. Resuspenderede pellets placeres på objektglas og fikseres. Prøverne are enzym-opløste. Murin-anti-*P. carinii* antistoffer og fluorescens-markerede anti-mus antistoffer tilføjes efter inkubation, skylning, opsugning, og lufttørring. Gennem et fluorescens-mikroskop vises oocyster som mellemklare til klart æblegrønne og kan være jævnt eller ujævnt markeret. Tilstedeværelsen af *P. carinii* oocyster i bronchoalveolær udskylningsvæske eller induceret sputum viser en *P. carinii* infektion.

KIT KOMPONENTER

REAG A	Anti- <i>P. carinii</i> monoklonale antistoffer	1 × 1 mL	Murin-anti- <i>P. carinii</i> monoklonale antistoffer, kvæg serumalbumin, 0,1% (w/v) natriumazid. Parat-til-brug.	Xn 
REAG B	FITC-konjugeret anti-mus antistoffer	1 × 1 mL	Fluorescens-isothiocyanat (FITC) konjugeret anti-mus antistoffer, Evans Blue modfarvning. Parat-til-brug.	
REAG C	Enzym (Frysetørret)	1 hætteglas	Forbehandlet enzym til kliniske prøver. Rekonstituér med 200 µL 0,001M HCl (medfølger) og fortynd før brug.	Xn 
REAG D	Fortyndet saltsyre (0,001M HCl)	1 × 0,5 mL	For enzym-rekonstitution. Parat-til-brug.	
REAG E	Enzym opløsningsmiddel	1 × 3 mL	Tris-buffer med enzym-aktivator. Parat-til-brug.	
SPCM SLD	Patientprøveobjektglas	25 objektglas	PTFE-belagte (gule) objektglas med fire firkantede præperatfordybninger.	
REAG F	Monteringsmedium	2 × 3 mL	Phosphat-buffered glycerol, Citifluor fotoblegende hæmningsmiddel. Parat-til-brug.	

OPBEVARING AF REAGENTER

Vejledning om håndtering og procedurer

- Opbevar kit-komponenterne ved 2-8°C og brug dem indtil datoen for udløb som vist på etiketterne. Brug ikke reagenter udover udløbsdatoen.
- Bland ikke forskellige kit.
- Frys ikke kit.
- Det frysetørrede enzym skal rekonstitueres før brug, se afsnittet Analyseforberedelse. Alle andre reagenter er parate til brug.
- Efter rekonstitution med 200 µL 0,001M HCl er det frysetørrede enzym stabilt i op til 3 måneder fra rekonstitutionsdatoen, hvis opbevaret ved 2-8°C.
- Udsæt ikke monteringsmediet for direkte lys under opbevaring. Opbevar ved 2-8°C eller ved 18-25°C.
- Patientprøveobjektglassene kan opbevares ved 18-25°C.
- Et bundfald kan dannes i det fortyndede enzym. Hvis dette opstår, er der ikke behov for genopløsning, idet der ingen skadelig effekt er på prøvens virkning.
- Undgå kontaminering af reagenterne. Brug en ubrugt engangspipettespids for hver reagent eller prøvemanipulation.

Præparatindhentning, opbevaring og forbehandling

Denne analyse skal bruges med human bronchoalveolære udskylnings- og inducerede sputumprøver. Det er bedst, hvis op til 30 mL bronchoalveolær udskylning og 2-4 mL induceret sputum indhentes i sterile beholdere ved brug af passende procedurer og afprøves snarest muligt efter indhentning. For at inaktivere mulige humane-immundefekt vira der kan forefindes, anbefales det stærkt at suspensionen af klinisk materiale fortyndes med en lige del absolut ethanol og inkuberes i ti minutter ved stuetemperatur (18-25°C) før behandling. Afskaffelse af affaldsmateriale bør foretages i overensstemmelse med lokale foreskrifter.

Sputumprøver bør forbehandles (homogenisering eller inkubation) ved tilføjelse af "Sputasol", "Sputolysin" eller lignende slimopløsende middel ved stuetemperatur (18-25°C), ti minutter før analysering.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

Kun for *in vitro* diagnostik.

Sikkerhedsforanstaltninger

- Vejledningerne i denne brochure bør overholdes nøje, især for håndtering og opbevaringsforhold for kit-reagenter og kliniske prøver.
- Alle patientprøver bør anses som potentielt smitsomme og bør behandles på samme måde som ethvert andet biohazard materiale. CDC/NIH Sundhedsvejledningen "Biosafety in Microbiological and Biomedical

Laboratories", 5th edition, 2007, (Biosikkerhed i mikrobiologiske og biomedicinske laboratorier) beskriver, hvorledes disse materialer bør behandles i overensstemmelse med god skik og brug i laboratorier.¹⁴

3. Der bør ikke pipetteres med mund.
4. Der bør ikke ryges, spises, drikkes eller foretages brug af kosmetik i områder hvor kit og prøver behandles.
5. Enhver hudsygdom, sår, hudafskrabninger eller andre hudlæsioner bør beskyttes.
6. Anti-*P. carinii* Antistoffet og FITC-Konjugationen indeholder natriumazid der kan reagere med bly- og kobber og derved danne yderst eksplosive metalazider. Ved bortskaffelse bør der efterskylles med store mængder vand for at forhindre en opbygning af azider.
7. Grundliggende sikkerhedsdataark for alle farlige komponenter indeholdt i dette kit kan fås ved efterspørgsel hos Axis-Shield Diagnostics.



A ANTISTOFFER
Sundhedsskadelig



C ENZYM
Sundhedsskadelig

R22: Farlig ved indtagelse

S23: Undgå indånding af røg

S29/35: Må ikke komme i kloak afløb; Stoffet og emballagen skal bortskaffes på en sikker måde

S36/37/39: Brug særligt arbejdstøj, egnede beskyttelses-handsker og –briller/ansigtsskærm

R42: Kan give allergi ved indånding

S22: Undgå indånding af støv

S29/35: Må ikke komme i kloak afløb; Stoffet og emballagen skal bortskaffes på en sikker måde

S36/37/39: Brug særligt arbejdstøj, egnede beskyttelses-handsker og –briller/ansigtsskærm

S45: Ved ulykkestilfælde eller ved ildebefindende er omgående lægebehandling nødvendig; vis etiketten, hvis det er muligt

S63: Ved ulykkestilfælde ved indånding bringes tilskadekomne ud i frisk luft og holdes i ro

FORBEREDELSE

Nødvendigt materiale/udstyr der ikke medfølger

1. Præcisionspipetter for 5 µL, 15 µL, 20 µL og 200 µL
2. Centrifuge for mængder op til ca. 30 mL ved 3000 x g.
3. Destilleret/ultrarent vand.
4. Vaskeflaske med destilleret/ultrarent vand.
5. Analar eller lignende grad acetone.
6. Analar eller lignende grad absolut ethanol.
7. Inkubator på 37°C.
8. Befugtet objektglasinkubationskammer på 37°C.
9. Mikroskopdækglasser 18 x 18 mm og 50 x 20 mm
10. Ultraviolet mikroskop udstyret til at se fluorescens og Evans Blue fluorescens.
11. Cytospin (f.eks. Cytospin 2), valgfrit.
12. Et ur der kan måle 5 til 30 minutter.
13. Opsugningsmateriale.
14. Et passende slimopløsende middel for inducerede sputumprøver, f.eks. Sputolysin (Behring Diagnostic) eller Sputasol (Oxoid). Bruges som anbefalet af fabrikanten; alternativt, brug 0,1% Dithiothreitol (w/v) opløsning i forholdet 1:1 med prøvemængden og inkubér ved 37°C så lang tid som nødvendigt.
N.B.: Dithiothreitol kan virke irriterende for øjne og hud. Kommer det i kontakt med hud eller øjne, skylles der efter med vand i mindst 10 minutter. Hvis der stadig er irritation, søges lægehjælp.
15. Phosphat-buffered salin.

Analyseforberedelse

Alle reagenter bør opnå stuetemperatur.

Rekonstituer frysetørret enzym med 200 µL 0,001M HCl; derved opnås et 10X koncentrat. Skriv rekonstitutionsdatoen på etiketten og lad stå i stuetemperatur (18-25°C) i 10 minutter. Bland forsigtigt ved inversion idet der sikres, at alle partikler er i kontakt med opløsningen. Det rekonstituerede enzym er stabilt i 3 måneder ved 2-8°C.

ANALYSEPROTOKOL

Forbehandling af prøver

Patientprøver bør testes så hurtigt som muligt efter indhentning. Ved analyse bør man være opmærksom på prøvernes mulige HIV-status, og alle anbefalede forholdsregler bør foretages ved håndtering af sådanne prøver.

Inducerede sputumprøver bør forbehandles med et slimopløsende middel f.eks. Sputasol. Ikke-mucoide prøver, som for eksempel BAL, behøver normalt ikke denne mukolytiske procedure.

Protokol

1. Centrifuger prøverne i 15 minutter ved 3000 x g, og vask partikel/pelletmaterialet i destilleret/ultrarent vand. Gentag en eller to gange til, idet det sikres at materialet er totalt resuspenderet mellem afvaskningerne.
2. Resuspendér den endelige pellet i lidt destilleret/ultrarent vand, så materialekoncentrationen ikke er for stor, og vortex derefter.
3. Spred 10-20 µL over en eller flere patientprøveobjektglas fordybninger. Lad fordampe til tørt ved 37°C. Hvis Cytospin (f.eks. Cytospin 2) forefindes, roteres 0,4 – 0,5 mL BAL eller IS ved 900 rpm, idet der bruges et hvidt og et brunt filter.
4. Fiksér prøverne ved at overlægge med 1-2 dråber Analar (eller samme kvalitet) acetone. Lad fordampe ved stuetemperatur.
5. **Skyl Cytospin præparaterne med løbende destilleret/ultrarent vand for at fjerne salte fra prøven, idet disse kan formindske enzym-opløsningens virkningsfuldhed.**
6. Lad objektglassene lufttørre.
7. **Fortynd** det rekonstituerede enzym **1 i 10 (1+9) med enzym-opløsningsmiddel.** Fortynd kun den mængde rekonstitueret enzym der skal bruges med det samme.
8. Overlæg tørrede og fikserede prøver med **20 µL** fortyndet enzym. Sørg for at hele fordybelsens område er dækket af reagent.
9. Inkubér objektglassene i NØJAGTIGT 30 minutter i et befugtet kammer indstillet til 37°C. Der vil opstå en over-opløsning af oocyster, hvis inkubationen fortsættes længere end 30 minutter. Derved kan oocyster forekomme mindre markerede og være sværere at identificere.
10. Skyl objektglassene med destilleret/ultrarent vand ved at lade vandet løbe over fordybningernes overflade. Lad ikke vandstrålen ramme prøven direkte.
11. Opsug og lufttør objektglassene.
12. Tilføj **15 µL** Anti-*P. carinii* antistoffer til prøverne. Sørg for at hele fordybelsens område er dækket af reagent. Inkubér i et befugtet kammer for 15 minutter ved 37°C.
13. Skyl fordybningerne som beskrevet i trin 10, opsug og lufttør.
14. Tilføj **15 µL** FITC-konjugeret anti-mus antistof til prøverne. Sørg for at hele fordybelsens område er dækket af reagent. Inkubér i et befugtet kammer for 15 minutter ved 37°C.
15. Skyl, opsug og lufttør fordybningerne.
16. Læg en dråbe monteringsmedie på hver fordybning der er i brug og tilføj et dækglas af passende størrelse. Objektglasset inverteres på absorberende materiale og der trykkes let for at fjerne overflødig monteringsmedie og luftbobler.
17. Undersøg prøverne for klare til mellemklare æblegrønne oocyster, der kan være enten jævnt eller ujævnt markeret. Cellulært affald og andet materiale kan modfarves med Evans Blue, som vil fluorescere rødt. Undersøg hele prøveområdet.

RESULTATFORTOLKNING

POSITIVT RESULTAT - Fem eller flere fluorescerende oocyster over hele objektglasset.

USIKKERT RESULTAT - Et til fem fluorescerende oocyster.

NEGATIVT RESULTAT - Ingen fluorescerende oocyster. Er der stadig mistanke om *P. carinii* infektion, gentages analysen med mere podestof.

PRÆSTATIONS DATA

CENTRE 1¹⁰

223 BAL og IS prøver fra HIV-patienter med luftvejssymptomer blev evalueret og sammenlignet med modificeret Grocott farvning. Generel overensstemmelse=90,6%.

Af 21 (9,4%) afvigende resultater, blev seks senere prøver opnået, og fem af seks resultater var positive ved begge tests.

CENTRE 2⁸

135 IS prøver blev evalueret og sammenlignet med Grocott farvning. Generel overensstemmelse=88,9%.

Femten resultater (11,1%) var Detect IF *P. carinii* positive/usikre og Grocott negative. Forfatterne konkluderede, at dette viser en forøget sensitivitet for *P. carinii* i cytologiske IS-præparationer med immunofluorescens teknik sammenlignet med konventionelle farvninger.

CENTRE 3⁹

254 BAL og IS prøver fra 75 patienter med AIDS, andre immunsvækkede patienter, deriblandt transplantationspatienter, og patienter med diagnosen 'atypisk pneumoni' blev evalueret og sammenlignet med Grocott farvning. Generel overensstemmelse=94,1%.

Femten resultater (5,9%) var Detect IF *P. carinii* positive/usikre og Grocott negative. Forfatterne konkluderede, at Detect IF testen var mere sikker og sensitiv end Grocott-teknikken.

CENTRE 4⁶

50 BAL og 50 IS prøver blev testet for *P. carinii* infektion ved hjælp af indirekte immunofluorescens, direkte immunofluorescens, modificeret Wright-Giemsa farvning and modificeret silver farvning. En positiv prøve blev defineret, som enhver podning der var positiv ved to eller flere metoder.

Ved brug af denne definition, var sensitiviteten og specificiteten af DETECT IF *P. carinii* som følger:

BAL Sensitivitet = 86% Specificitet = 100%

IS Sensitivitet = 97% Specificitet = 100%

CENTRE 5

152 BAL prøver fra patienter med kliniske tegn på *P. carinii* pneumoni blev evalueret og sammenlignet med Grocott farvning. Resultaterne for hver metode blev sammenlignet med kliniske tegn på *P. carinii* pneumoni (PCP). I fem tilfælde, var de kliniske bevisresultater usikre; fire var Detect IF positive og Grocott negative, en var Grocott positiv og Detect IF negativ.

Generel overensstemmelse af DETECT IF med kliniske tegn på PCP = $\frac{146}{147} = 99,3\%$ (et resultat var usikkert med IF)

Generel overensstemmelse af Grocott stain med kliniske tegn på PCP = $\frac{140}{147} = 95,2\%$

Generel overensstemmelse af DETECT IF med Grocott = 94,5%

BRUGSBEGRÆNSNINGER

1. Et negativt resultat udelukker ikke muligheden for en *P. carinii* infektion. Resultater bør tolkes på baggrund af alle kliniske og diagnostiske oplysninger. Hvis nødvendigt bør yderligere prøver indhentes.
2. For meget slim i prøverne kan forhindre tilstrækkelig farvning.
3. Det FITC-konjugerede anti-mus antistof har potentialet til at krydsreagere med *Candida albicans*, hvis det er tilstede i patientprøverne, hvilket kan fejlfortolkes som falsk positive resultater.¹⁵

Detect IF *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) testet är ett indirekt kvalitativt immunofluorescenskit för detektion av *P. carinii* oocyster i human bronkoalveolär lavage och inducerad sputum. Den är avsedd som hjälp vid diagnos av misstänkt *P. carinii* infektion. Resultaten skall tolkas tillsammans med all övrig klinisk och diagnostisk information.

INTRODUKTION

Pneumocystis carinii är en eukaryotisk mikroorganism med osäker taxonomi. Nyligen utförda ribosomala RNA homologistudier har visat identiska aminosyresekvensen med vissa svampar, men klassificering av organismen är fortfarande föremål för diskussion.¹

P. carinii är utbredd och infekterar människor och andra däggdjur; infektionsvägen antas vara luftburen.¹ Det är en betydande patogen hos immunkomprometterade, speciellt patienter med AIDS^{2,3} där det är en etablerad orsak till lunginfektion. Svält, hematologiska maligniteter, kollagena kärlsjukdomar, primär cellulär immunbrist och immunundertryckande behandling, till exempel hos transplattpatienter och leukemipatienter på cytotoxiska läkemedel är faktorer som ökar sannolikheten för infektion med *P. carinii* pneumoni.




Starten av *P. carinii* pneumoni kan vara klart snabb eller komma smygande. När den är kliniskt uppenbar visar den ökad andningsfrekvens och febertoppar. Lungröntgen visar ett diffust infiltrat; lungfunktionstester visar alveolär-kapillär blockering orsakad av nedsatt gasutbyte i alveolerna, vilket ger hypoxemi och hypercapni.

För närvarande kan *P. carinii* pneumoni diagnostiseras genom observation av *P. carinii* i antingen öppet lung- eller transbronkialt lungbiopsimaterial, bronkoalveolär lavage^{4,5} eller inducerad sputum. Det kan visualiseras med en rad olika icke-specifika färgningar, inklusive Gomori metenamin silver, toluidin blue-O, Gram-Weigert, Giemsa och Wright-Giemsa. Eftersom alla dessa färgningar reagerar med jäst och andra strukturer, måste *P. carinii* särskiljas på grundval av morfologi. Färgningstekniker är tidskrävande och kräver ofta en teknisk expertis på hög nivå vid tolkning av resultaten. Monoklonala antikroppar specifika för *P. carinii* har blivit tillgängliga, vilket tillåter utveckling av immunfluorescensmetoder för att snabbt och utan tvekan identifiera *P. carinii* oocyster i bronkoalveolärt material och inducerad sputum.^{8,9} Detect IF *P. carinii* testet använder en monoklonal murinantikropp som är reaktiv med *P. carinii* från både människa och gnagare i en enkel och snabb test för detektion och identifiering av *P. carinii* i human bronkoalveolär lavagevätska (BAL) och inducerad sputum. (IS).

ANALYSRINCIP

Bronkoalveolär lavagevätska eller förbehandlade inducerade sputumprov centrifugeras och tvättas. Kornen resuspenderas, placeras på objektglas och fixeras. Proven bryts ner av enzymer. Murin anti-*P. carinii* antikropp och fluorescensmärkt anti-musantikropp tillsätts i tur och ordning efter inkubation, sköljning, läskning och lufttorkningssteg. När man tittar på oocysterna med ett fluorescensmikroskop visas de medelljust till ljust äppelgröna och kan vara jämnt eller ojämnt märkta. Närvaro av *P. carinii* oocyster i bronkoalveolär lavagevätska eller inducerad sputum tyder på *P. carinii* infektion.

KITKOMPONENTER

REAG A	Anti- <i>P. carinii</i> monoklonal antikropp	1 × 1 mL	Murin anti- <i>P. carinii</i> monoklonal antikropp, bovinserumalbumin, 0,1 % (w/v) natriumazid. Bruksfärdig.	Xn 
REAG B	FITC-konjugerad anti-musantikropp	1 × 1 mL	FITC (Fluorescein-isothiocyanat) konjugerad anti-musantikropp, Evans Blue kontrastfärgning. Bruksfärdig.	
REAG C	Enzym (lyofiliserad)	1 flaska	Förbehandlingsenzym för kliniska prov. Rekonstituera med 200 µL 0,001 M HCl (ingår) och späd före användning.	Xn 
REAG D	Utspädd saltsyra (0,001 M HCl)	1 × 0,5 mL	För enzymrekonstitution. Bruksfärdig.	
REAG E	Enzymspädningsmedel	1 × 3 mL	Trisbuffert med enzymaktivator. Bruksfärdig.	
SPCM SLD	Objektglas för patientprov	25 glas	PTFE-belagda (gula) objektglas med fyra kvadratiska provbrunnar.	
REAG F	Monteringsmedel	2 × 3 mL	Fosfatbuffrad glycerol, Citifluor fotoblekningshämmare. Bruksfärdig.	

FÖRVARING AV REAGENSER

Hantering och procedurkommentarer

1. Förvara kitkomponenter vid 2-8°C och använd dem fram till utgångsdatumet angivet på etiketterna. Använd inte reagenser som har gått ut.
2. Blanda inte olika kit.
3. Frys ej.
4. Det lyofiliserade enzymet måste rekonstitueras före användning, se avsnittet Preparation för analys. Alla övriga reagenser är bruksfärdiga.
5. Efter rekonstitution med 200 µL 0,001 M HCl är det lyofiliserade enzymet stabilt i upp till 3 månader från rekonstitutionsdatumet om det förvaras vid 2-8°C.
6. Exponera inte monteringsmediet för direkt solljus under förvaring. Förvara vid 2-8°C eller vid 18-25°C.
7. Objektglas med patientprov kan förvaras vid 18-25°C.
8. En fällning kan bildas i enzymutspädningen. Om detta skulle hända, försök inte lösa upp den, den har ingen nedsättande effekt på testets verkan.
9. Undvik kontamination av reagenserna. Använd en ny engångs pipettspets för varje reagens eller provmanipulering.

Provinsamling, förvaring och förbehandling

Analysen är för användning med human bronkoalveolär lavage och inducerade sputumprov. Idealiskt skall upp till 30 mL bronkoalveolär lavage och 2-4 mL inducerad sputum insamlas i sterila kärl med lämpliga procedurer och testas så snart som möjligt efter insamling. För att inaktivera eventuella human immunbristvirus som kan vara närvarande rekommenderas det starkt att suspensionen med kliniskt material späds ut med en lika stor volym etanol och inkuberas i tio minuter vid rumstemperatur (18-25°C) före behandling. Kassera avfallsämnen enligt lokala föreskrifter.

Sputumprov skall förbehandlas (homogenisering eller inkubation) genom tillsättning av "Sputasol", "Sputolysin" eller liknande mukolytiskt medel i tio minuter vid rumstemperatur (18-25°C) före analysen.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Endast för diagnostisk användning in vitro.

Säkerhetsåtgärder

1. Följ strikt anvisningarna i detta häfte, särskilt beträffande hantering och förvaringsvillkor för kitreagenser och kliniska prov.
2. Alla patientprov skall betraktas som potentiellt smittsamma och hanteras med samma försiktighetsåtgärder som alla andra potentiella biofarliga material. CDC/NIH Häsohdbok "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 5th edition, 2007, beskriver hur dessa material skall hanteras enligt Good Laboratory Practice.¹⁴
3. Pipettera inte med munnen.
4. Rök inte, ät inte, drick inte och anlägg inte makeup inom områden där kit och prov hanteras.
5. Alla hudproblem, skärsår, skavsår och andra hudlesionser skall skyddas på lämpligt sätt.
6. Anti-*P. carinii* antikropp och FITC-konjugat innehåller natriumazid som kan reagera med bly- och kopparledningar och bilda högexplosiva metallazider. Skölj med stora mängder vatten när det bortskaffas, så att inte metallazider ackumuleras i avloppet.
7. Materialsäkerhetsdatablad för alla farliga komponenter i detta kit finns tillgängliga på begäran från Axis-Shield Diagnostics.



A ANTIKROPP
Hälsoskadlig



C ENZYM
Hälsoskadlig

R22: Farligt vid förtäring

S23: Undvik inandning av rök

S29/35: Töm ej i avloppet, oskadliggör produkt och förpackning på säkert sätt

S36/37/39: Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd

R42: Kan ge allergi vid inandning

S22: Undvik inandning av damm

S29/35: Töm ej i avloppet, oskadliggör produkt och förpackning på säkert sätt

S36/37/39: Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar samt skyddsglasögon eller ansiktsskydd

S45: Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare. Visa om möjligt etiketten

S63: Vid olycksfall via inandning, flytta den drabbade till frisk luft och låt vila

F Ö R B E R E D E L S E

Nödvändigt, men ej tillhandahållet material/utrustning

1. Precisionspipetter för dispensering av 5 µL, 15 µL, 20 µL och 200 µL.
2. Centrifug för volymer upp till cirka 30 mL vid 3000 x g.
3. Destillerat/ultrarent vatten.
4. Tvättflaska innehållande destillerat/ultrarent vatten.
5. Analar (för kromatografi) eller ekvivalent acetonkvalitet.
6. Analar (för kromatografi) eller ekvivalent absolut alkohol.
7. Inkubator vid 37°C.
8. Fuktinkubationskammare för objektglas vid 37°C.
9. Mikroskoptäckglas 18 x 18 mm och 50 x 20 mm.
10. Ultraviolet mikroskop utrustat för att se fluorescein och Evans Blue fluorescens.
11. Cytospin (t.ex. Cytospin 2), tillval.
12. Timer för 5 till 30 minuter.
13. Läskapper/tissuematerial
14. Lämplig mukolytiskt ämne för inducerade sputumprov, t.ex. Sputolysin (Behring Diagnostic) eller Sputasol (Oxoid). Använd som rekommenderat av tillverkaren, alternativt använd 0,1 % Ditiotreitol (w/v) lösning i förhållandet 1:1 med provvolymen och inkubera vid 37°C så länge det behövs.
N.B. Ditiotreitol kan irritera ögon och hud. Om kontakt med hud eller ögon förekommer, skölj med vatten i minst 10 minuter. Om obehaget fortsätter, sök medicinsk hjälp.
15. Fosfatbuffrad saltlösning.

Preparation för analysen

Låt samtliga reagenser uppnå rumstemperatur.

Rekonstituera lyofiliserat enzym med 200 µL 0,001 M HCl; detta ger en 10X koncentrerad lösning. Skriv ner rekonstitutionsdatum på etiketten och låt stå i rumstemperatur (18-25°C) i tio minuter. Blanda försiktigt genom inversion och se till att alla partiklar är i lösning. Rekonstituerat enzym är stabilt i 3 månader vid 2-8°C.

A N A L Y S P R O T O K O L L

Förbehandling av prov

Patientprov bör testas så snart som möjligt efter insamling. Vid utförande av en analys måste man vara medveten om den potentiella HIV-statusen hos proven och vidta alla de rekommenderade försiktighetsåtgärderna vid hantering av sådana prov.

Inducerade sputumprov skall förbehandlas med en mukolytiskt agens, t.ex. Sputasol. Icke-mukoida prov, som t.ex. BAL behöver normalt inte den mukolytiska proceduren.

Protokoll

1. Centrifugera proven i 15 minuter vid 3000 x g och tvätta partiklarna/kornen i destillerat/ultrarent vatten. Upprepa en eller två gånger och se till att kornen resuspenderas helt mellan tvättningarna.
2. Resuspendera de slutliga kornen i en liten mängd destillerat/ultrarent vatten så att materialets densitet inte är alltför stor och vortexa.

3. Sprid 10-20 µL över hela området på en eller fler objektglasbrunnar för patientprov. Förånga till torkning vid 37°C. Om en Cytospin (t.ex. Cytospin 2) finns tillgänglig, spinn 0,4 till 0,5 mL BAL eller IS vid 900 rpm med användning av ett vitt och ett tanfilter.
4. Fixera proven genom att droppa över 1-2 droppar Analar (eller ekvivalent kvalitet) aceton. Låt förånga vid rumstemperatur.
5. **Skölj Cytospinpreparationer med en stråle destillerat/ultrarent vatten för att avlägsna salter från proven eftersom de minskar enzymnedbrytningens verkan.**
6. Lufttorka glaset.
7. **Späd** det rekonstituerade enzymet **1 i 10 (1+9) med enzymutspädning**. Späd bara tillräckligt med rekonstituerad enzym för dina omedelbara behov.
8. Täck torkade och fixerade prov med **20 µL** spädd enzym. Kontrollera att hela brunnsområdet är täckt av reagensen.
9. Inkubera glaset i EXAKT 30 minuter i en fuktkammare inställd på 37°C. Övernedbrytning av oocyster sker om inkubationen fortsätter i mer än 30 minuter. Oocyster kan då bli mindre karakteristiska och svårare att identifiera.
10. Skölj glaset med destillerat/ultrarent vatten genom att låta en stråle vatten rinna över brunnarnas yta. Rikta inte strålen direkt mot proven.
11. Läska och lufttorka glaset.
12. Tillsätt **15 µL** anti-*P. carinii* antikropp till proven. Kontrollera att hela brunnsområdet är täckt av reagensen. Inkubera i fuktkammare i 15 minuter vid 37°C.
13. Skölj brunnarna så som beskrevs i steg 10, läska och lufttorka.
14. Tillsätt **15 µL** FITC-konjugerad anti-musantikropp till proven. Kontrollera att hela brunnsområdet är täckt av reagensen. Inkubera i fuktkammare i 15 minuter vid 37°C.
15. Skölj brunnarna, läska och lufttorka.
16. Placera en droppe monteringsmedium på varje brunn som används och täck med ett täckglas av lämplig storlek. Inverta glaset på en absorberande servett och tryck varsamt för att bli av med överskott av monteringsmedium och luftbubblor.
17. Undersök proven och leta efter ljusa till måttligt ljusa äppelgröna oocyster, som kan jämnt eller ojämnt märkta. Cellulärt skräp och annat material kan kontrastfärgas med Evans Blue som fluorescerar rött. Undersök hela provområdet.

T O L K N I N G A V R E S U L T A T E N

POSITIVT RESULTAT - Fem eller fler fluorescenta oocyster över hela glaset.

TVEKSAMT RESULTAT - En till fem fluorescenta oocyster.

NEGATIVT RESULTAT - Inga fluorescenta oocyster. Om *P. carinii* infektion fortfarande misstänks, upprepa analysen med ett tyngre inokulum.

R E S U L T A T D A T A

CENTER 1¹⁰

223 BAL och IS prov från HIV patienter med symtom i andningsorganen utvärderades och jämfördes med modifierad Grocott-färgning. Total överensstämmelse = 90,6 %.

Av 21 (9,4 %) avvikande resultat, erhöles sex nya prov och fem av dessa sex var positiva med båda testerna.

CENTER 2⁸

135 IS prov utvärderades och jämfördes med Grocott-färgning. Total överensstämmelse = 88,9 %.

Femton resultat (11,1 %) var Detect IF *P. carinii* positiva/tveksamma och Grocott-negativa. Författarna drog slutsatsen att detta tydde på en ökad sensitivitet för *P. carinii* cytologiska preparationer av IS med immunofluorescens teknik jämfört med konventionella färgningar.

CENTER 3⁹

254 BAL och IS prov från 75 patienter med AIDS, andra immunokomprometterade patienter, inklusive transplatatpatienter och patienter diagnostiserade som 'atypisk pneumoni' utvärderades och jämfördes med Grocott-färgning. Total överensstämmelse = 94,1 %.

Femton resultat (5,9 %) var Detect IF *P. carinii* positiva/tveksamma och Grocott-negativa. Författarna drog slutsatsen att Detect IF testet var mer tillförlitligt och sensitivt än Grocott-tekniken.

CENTER 4⁶

50 BAL och 50 IS prov testades för *P. carinii* infektion med hjälp av indirekt immunfluorescens, direkt immunfluorescens, modifierad Wright-Giemsa-färgning och modifierad silverfärgning. Ett positivt prov definierades som alla utstryk som var positiva med två eller fler metoder.

Med denna definition var sensitiviteten och specificiteten för DETECT IF *P. carinii* som följer,

BAL Sensitivitet = 86 % Specificitet = 100 %

IS Sensitivitet = 97 % Specificitet = 100 %

CENTRE 5

152 BAL prov från patienter med kliniska bevis för *P. carinii* pneumoni utvärderades och jämfördes med Grocott-färgning. Resultaten för varje metod jämfördes med det kliniska beviset för *P. carinii* pneumoni (PCP). I fem fall, var det kliniska bevisresultatet tvetydigt; fyra var Detect IF positiva och Grocott negativa, ett var Grocott positivt och Detect IF negativt.

Total överensstämmelse mellan DETECT IF och kliniska bevis för PCP = $\frac{146}{147} = 99,3\%$ (ett resultat var tvetydigt med IF)

Total överensstämmelse mellan Grocott färgning och kliniska bevis för PCP = $\frac{140}{147} = 95,2\%$

Total överensstämmelse mellan DETECT IF och Grocott = 94,5 %

PROCEDURBEGRÄNSNINGAR

1. Ett negativt resultat utesluter inte möjligheten för förekomst av en *P. carinii* infektion. Resultaten skall tolkas tillsammans med all övrig klinisk och diagnostisk information. Vid behov skaffa ett ytterligare prov.
2. Överskott på slem i proven kan förhindra adekvat färgning.
3. Den FITC-konjugerade anti-musantikroppen kan potentiellt korsreagera med *Candida albicans*, när den är närvarande i patientprover, vilket kan misstolkas som falskt positiva resultat.¹⁵

Η εξέταση Detect IF *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) είναι ένα κιτ έμμεσου ποιοτικού ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση ωκύστεων της *P. carinii* σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα και μηχανικώς προκαλούμενα πτύελα. Προορίζεται για επικουρική χρήση στη διάγνωση ενδεχόμενης λοίμωξης από *P. carinii*. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται υπό το φως όλων των κλινικών και διαγνωστικών πληροφοριών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Pneumocystis carinii* είναι ένας ευκαρυωτικός μικροοργανισμός αμφίβολης ταξινόμησης. Πρόσφατες μελέτες σχετικά με την ομολογία του ριβοσωματικού RNA έχουν δείξει πανομοιότυπες αλληλουχίες νουκλεϊκού οξέος με μερικούς μύκητες, αλλά η ταξινόμηση του οργανισμού εξακολουθεί να αποτελεί θέμα συζήτησης.¹

Η *P. carinii* υπάρχει παντού και μολύνει τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά. Η οδός της μόλυνσης θεωρείται ότι είναι μέσω του αέρα.¹ Αποτελεί ένα από τα κύρια παθογόνα για ανοσοκατασταλμένα άτομα, ειδικά ασθενείς με AIDS^{2,3} όπου αποτελεί αποδεδειγμένη αιτία πνευμονικής λοίμωξης. Ο υποσιτισμός, οι αιματολογικές κακοήθειες, οι αγγειακές νόσοι του κολλαγόνου, η πρωτοπαθής κυτταρική ανοσοανεπάρκεια και η ανοσοκατασταλτική θεραπεία, για παράδειγμα σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση και σε ασθενείς με λευχαιμία που λαμβάνουν κυτταροτοξικά φάρμακα, αποτελούν παράγοντες που αυξάνουν την πιθανότητα πνευμονίας από την *P. carinii*.




Η πνευμονία από *P. carinii* μπορεί να εκδηλωθεί είτε σαφώς και ταχέως είτε ύπουλα. Όταν υπάρχουν κλινικές ενδείξεις, τα χαρακτηριστικά της νόσου είναι η ταχύπνοια και ο κυμαινόμενος πυρετός. Στις ακτινογραφίες θώρακα εμφανίζεται διάχυτη διήθηση. Οι εξετάσεις πνευμονικής λειτουργίας δείχνουν βρογχοκυψελιδική απόφραξη που προκύπτει από ατελή ανταλλαγή αερίων στις κυψελίδες, προκαλώντας υποξαιμία και υπερκαπνία.

Επί του παρόντος, η πνευμονία από την *P. carinii* μπορεί να διαγνωσθεί μετά από διαπίστωση της παρουσίας της *P. carinii* είτε σε ανοικτό πνεύμονα είτε σε υλικό βιοψίας προερχόμενο από τους βρόγχους, σε βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα^{4,5} ή μηχανικώς προκαλούμενα πτύελα. Η απεικόνιση μπορεί να γίνει με διάφορες μη ειδικές χρώσεις μεταξύ των οποίων οι χρώσεις αργύρου μεθenaμίνης Gomori, κυανού-Ο τολουιδίνης, Gram-Weigert, Giemsa και Wright-Giemsa. Επειδή όλες αυτές οι χρώσεις αντιδρούν με ζυμομύκητες και άλλες δομές, η διάκριση της *P. carinii* πρέπει να γίνεται βάσει της μορφολογίας. Οι τεχνικές χρώσης είναι χρονοβόρες και συχνά απαιτούν υψηλό επίπεδο τεχνικής εξειδίκευσης για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Υπάρχουν διαθέσιμα μονοκλωνικά αντισώματα ειδικά για της ωκύστες της *P. carinii* κι έτσι είναι δυνατή η ανάπτυξη τεχνικών ανοσοφθορισμού για την ταχεία και αδιαμφισβήτητη ταυτοποίηση ωκύστεων *P. carinii* σε βρογχοκυψελιδικό υλικό^{6,7} και σε μηχανικώς προκαλούμενα πτύελα.^{8,9} Ο προσδιορισμός Detect IF *P. carinii* χρησιμοποιεί μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού αντιδραστικό τόσο με την ανθρώπινη όσο και με την προερχόμενη από τρωκτικά *P. carinii* κατά τη διάρκεια μιας απλής και ταχείας εξέτασης για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση της *P. carinii* σε ανθρώπινο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BAL) και μηχανικώς προκαλούμενα πτύελα (IS).

ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος ή μηχανικώς προκληθέντων πτυέλων που έχουν υποστεί προεπεξεργασία υποβάλλονται σε φυγοκέντριση και πλύση. Τα ιζήματα εναιωρούνται εκ νέου, τοποθετούνται πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες (πλακάκια) και σταθεροποιούνται. Τα δείγματα αποσυντίθενται μέσω ενζύμων. Αντίσωμα αντι-*P. carinii* ποντικού και σημασμένο μέσω φθορισμού αντίσωμα αντι-ποντικού προστίθενται με τη σειρά μετά τα βήματα επώασης, έκπλυσης, αφαίρεσης του επιπλέον αντιδραστηρίου με χρήση απορροφητικού χαρτιού και στεγνώματος στον αέρα. Με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού, οι ωκύστες εμφανίζονται με μετρίως έντονο έως έντονο πράσινο χρώμα μήλου και μπορεί να είναι σημασμένες με όμοιο ή ανάμοιο τρόπο. Η παρουσία ωκύστεων *P. carinii* στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα ή σε μηχανικώς προκαλούμενα πτύελα υποδηλώνει λοίμωξη από την *P. carinii*.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΚΙΤ

REAG A	Μονοκλωνικό αντίσωμα αντι- <i>P. carinii</i>	1 x 1mL	Μονοκλωνικό αντίσωμα αντι- <i>P. carinii</i> ποντικού, βόεια ορολευκωματίνη, 0,1% (w/v) αζίδιο του νατρίου. Έτοιμο για χρήση.	Xn 
REAG B	Αντίσωμα αντι-ποντικού συζευγμένο με FITC	1 x 1mL	Αντίσωμα αντι-ποντικού συζευγμένο με ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη (FITC), αντίθετη χρώση Evans Blue. Έτοιμο για χρήση.	
REAG C	Ένζυμο (λυοφιλοποιημένο)	1 φιαλίδιο	Ένζυμο προ-επεξεργασίας για κλινικά δείγματα. Ανασυστήστε με 200 µL 0,001M HCl (παρεχόμενο) και αραιώστε πριν από τη χρήση.	Xn 
REAG D	Αραιωμένο υδροχλωρικό οξύ (0,001 M HCl)	1 x 0,5 mL	Για ενζυμική ανασύσταση. Έτοιμο για χρήση.	
REAG E	Αραιωτικό ενζύμου	1 x 3 mL	Ρυθμιστικό διάλυμα Tris με ενεργοποιητή ενζύμου. Έτοιμο για χρήση.	
SPCM SLD	Πλακάκια δειγμάτων ασθενών	25 πλακάκια	Πλακάκια επιστρωμένα με PTFE (κίτρινο) με τέσσερις τετράγωνες υποδοχές για τα δείγματα.	
REAG F	Μέσο στερέωσης	2 x 3 mL	Γλυκερόλη ρυθμισμένη με φωσφορικά, επιβραδυντικό φωτολεύκανσης Citifluor. Έτοιμο για χρήση.	

ΦΥΛΑΞΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό και τη διαδικασία

- Φυλάσσετε τα στοιχεία του kit σε θερμοκρασία 2-8°C και χρησιμοποιήστε τα μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στις ετικέτες. Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια που έχουν λήξει.
- Μην αναμειγνύετε στοιχεία από διαφορετικά kit.
- Μην καταψύχετε τα kit.
- Το λυοφιλοποιημένο ένζυμο πρέπει να υποβάλλεται σε ανασύσταση πριν από τη χρήση, ανατρέξτε στην ενότητα "Προετοιμασία για τον προσδιορισμό". Όλα τα άλλα αντιδραστήρια είναι έτοιμα για χρήση.
- Μετά την ανασύσταση με 200 µL 0,001 M HCl, το λυοφιλοποιημένο ένζυμο παραμένει σταθερό για διάστημα έως 3 μηνών από την ημερομηνία ανασύστασης, εφόσον φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Κατά τη διάρκεια της φύλαξης μην επιτρέπετε την έκθεση του μέσου στερέωσης στην άμεση ηλιακή ακτινοβολία. Φυλάσσετε σε θερμοκρασία 2-8°C ή 18-25°C.
- Τα πλακάκια με τα δείγματα των ασθενών μπορούν να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 18-25°C.
- Στο αραιωτικό ενζύμου ενδέχεται να σχηματισθεί ίζημα. Αν συμβεί κάτι τέτοιο, μη επιχειρήσετε νέα διάλυση, δεν υπάρχει βλαβερή επίδραση στην αποτελεσματικότητα της εξέτασης.
- Αποφύγετε τη μόλυνση των αντιδραστηρίων. Χρησιμοποιήστε ένα καινούριο, αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για κάθε αντιδραστήριο ή για το χειρισμό των δειγμάτων.

Συλλογή, φύλαξη και προ-επεξεργασία δειγμάτων

Ο προσδιορισμός προορίζεται για χρήση με δείγματα βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος και μηχανικώς προκαλούμενων πτυέλων. Το ιδανικό είναι να συλλεχθούν έως 30 mL βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος και 2-4 mL μηχανικώς προκαλούμενων πτυέλων σε αποστειρωμένα δοχεία με χρήση των κατάλληλων διαδικασιών και να υποβληθούν σε εξέταση το συντομότερο δυνατό μετά τη συλλογή. Για να αδρανοποιηθεί τυχόν υπάρχων ιός της ανοσοανεπάρκειας του ανθρώπου, συνιστάται οπωσδήποτε να αραιώνεται το εναιώρημα του κλινικού υλικού με ίσο όγκο απόλυτης αιθανόλης και να επωάζεται για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από την επεξεργασία. Απορρίψτε τα απόβλητα σύμφωνα με τους κατά τόπους ισχύοντες κανονισμούς.

Τα δείγματα πτυέλων πρέπει να υποβάλλονται σε προ-επεξεργασία (ομογενοποίηση ή επώαση) με την προσθήκη "Sputasol", "Sputolysin" ή κάποιου παρόμοιου βλεννολυτικού παράγοντα, επί δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C), πριν από τον προσδιορισμό.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Προειδοποιήσεις ασφαλείας

1. Συμμορφωθείτε απολύτως με τις οδηγίες που περιλαμβάνονται στο παρόν φυλλάδιο, ιδιαίτερα εκείνες που αφορούν τις συνθήκες χειρισμού και φύλαξης των αντιδραστηρίων του κιτ και των κλινικών δειγμάτων.
2. Όλα τα δείγματα ασθενών πρέπει να θεωρούνται δυνητικώς μολυσματικά και ο χειρισμός τους να γίνεται με τις ίδιες προφυλάξεις που ισχύουν για οποιοδήποτε άλλο δυνητικά βιολογικώς επικίνδυνο υλικό. Το Εγχειρίδιο Υγείας της CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Βιολογική ασφάλεια σε μικροβιολογικά και βιοϊατρικά εργαστήρια), 5ος έκδοση, 2007, περιγράφει ποιος θα πρέπει να είναι ο χειρισμός των υλικών αυτών σύμφωνα με την Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική.¹⁴
3. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας.
4. Μην καπνίζετε, μην τρώτε, μην πίνετε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στους χώρους όπου γίνεται χειρισμός των κιτ και των δειγμάτων.
5. Οποιαδήποτε σημεία με δερματικές παθήσεις, κοψίματα, γδαρσίματα και άλλες δερματικές βλάβες θα πρέπει να προστατεύονται κατάλληλα.
6. Το σύζευγμα αντισώματος αντι-*P. carinii* και FITC περιέχει αζίδιο του νατρίου, το οποίο ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη, ξεπλύνετε με άφθονο νερό για την πρόληψη της συσσώρευσης αζιδίων.
7. Τα φύλλα δεδομένων ασφαλείας των υλικών για όλα τα επικίνδυνα συστατικά που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό διατίθενται από την Axis-Shield Diagnostics κατόπιν σχετικού αιτήματος.



A ANTISΩΜΑ

Επιδλαδές

R22: Επιβλαβές σε περίπτωση καταπόσεως

S23: Μην αναπνέετε καπνούς

S29/35: Μη ρίχνετε τα υπολείμματα στην αποχέτευση; Πάρτε τις απαραίτητες προφυλάξεις προκειμένου να απορριψετε (πετάξετε) το προϊόν και τη συσκευασία του

S36/37/39: Φοράτε κατάλληλη ηροστατευτική ενδυμασία, λάντια και μυμκευή προστασίας ματιών/προσώπου



C ΈNZYMO

Επιδλαδές

R42: Δύναται να προκαλέσει ευαισθητοποίηση διά της εισπνοής

S22: Μην αναπνέετε τη σκόνη

S29/35: Μη ρίχνετε τα υπολείμματα στην αποχέτευση; Πάρτε τις απαραίτητες προφυλάξεις προκειμένου να απορριψετε (πετάξετε) το προϊόν και τη συσκευασία του

S36/37/39: Φοράτε κατάλληλη ηροστατευτική ενδυμασία, λάντια και μυμκευή προστασίας ματιών/προσώπου

S45: Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισζανζείτε αδιαζεοία, ζητήστε αμέοως ιατρική συζουλή (δειξε την επικέτα όπον αυτό είναι δυνατό)

S63: Σε περίπτωση ατυχήματος λόγω εισπνοής: απομακρύνετε το θύμα από το μολυσμένο χώρο και αφήστε το να ηρεμήσει

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ

Υλικά/εζοπλισμός που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

1. Πιπέτες ακριβείας για τη διανομή 5 μL, 15 μL, 20 μL και 200 μL.
2. Συσκευή φυγοκέντρισης για όγκους έως περίπου 30 mL σε 3.000 x g.
3. Απεσταγμένο/υπερκαθαρό νερό.
4. Φιάλη πλύσης που περιέχει απεσταγμένο/υπερκαθαρό νερό.
5. Ακετόνη Analar ή αντίστοιχης κατηγορίας.
6. Απόλυτη αιθανόλη Analar ή αντίστοιχης κατηγορίας.
7. Επωαστήρας στους 37°C.
8. Υγροποιημένος θάλαμος επώασσης για τα πλακάκια στους 37°C.
9. Καλυπτρίδες μικροσκοπίου, 18 x 18 mm και 50 x 20 mm.
10. Μικροσκόπιο υπεριώδους ακτινοβολίας κατάλληλα εζοπλισμένο για να βλέπει το φθορισμό της φλουορεσκεϊνης και της χρωστικής Evans Blue.
11. Cytospin (π.χ. Cytospin 2), προαιρετικό.
12. Χρονόμετρο για 5 έως 30 λεπτά.
13. Απορροφητικό υλικό/πανί.

14. Κατάλληλος βλεννολυτικός παράγοντας για δείγματα μηχανικώς προκαλούμενων πτυέλων, π.χ. Sputolysin (Behring Diagnostic) ή Sputasol (Oxoid). Χρησιμοποιήστε σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήστε διάλυμα 0,1% Dithiothreitol (w/v) σε αναλογία 1:1 με τον όγκο του δείγματος και επώαστε στους 37° C όσο απαιτείται.
Σημείωση. Το Dithiothreitol μπορεί να ερεθίσει τα μάτια και το δέρμα. Αν λάβει χώρα επαφή με το δέρμα ή τα μάτια, ξεπλύνετε με νερό επί 10 λεπτά τουλάχιστον. Αν υπάρχει ενόχληση, ζητήστε τη συμβουλή γιατρού.
15. Αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά.

Προετοιμασία για τον προσδιορισμό

Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να ισορροπήσουν με τη θερμοκρασία δωματίου.

Ανασυστήστε το λυοφιλοποιημένο ένζυμο με 200 μL 0,001 M HCl. Το αποτέλεσμα είναι συμπυκνωμένο διάλυμα 10X. Καταγράψτε την ημερομηνία ανασύστασης πάνω στην ετικέτα και αφήστε για δέκα λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (18 -25°C). Αναμείξτε απαλά με αναστροφή, αφού βεβαιωθείτε ότι όλο το σωματιδιακό υλικό είναι μέσα στο διάλυμα. Το ανασυσταθέν ένζυμο παραμένει σταθερό για 3 μήνες στους 2-8°C.

Π Ρ Ω Τ Ο Κ Ο Λ Λ Ο Τ Ο Υ Π Ρ Ο Σ Δ Ι Ο Ρ Ι Σ Μ Ο Υ

Προ-επεξεργασία των δειγμάτων

Τα δείγματα των ασθενών θα πρέπει να εξετάζονται όσο το δυνατόν πιο σύντομα μετά τη συλλογή. Όταν εκτελείτε έναν προσδιορισμό, θα πρέπει να γνωρίζετε αν υπάρχει πιθανότητα τα δείγματα να είναι μολυσμένα με τον ιό HIV και να λαμβάνετε όλες τις συνιστώμενες προφυλάξεις σχετικά με το χειρισμό παρόμοιων δειγμάτων.

Δείγματα μηχανικώς προκαλούμενων πτυέλων πρέπει να υποβάλλονται σε προ-επεξεργασία με ένα βλεννολυτικό παράγοντα, π.χ. Sputasol. Δείγματα που δεν περιέχουν βλέννα, όπως τα BAL, κανονικά δε θα πρέπει να χρειάζονται τη βλεννολυτική διαδικασία.

Πρωτόκολλο

1. Φυγοκεντρίστε τα δείγματα για 15 λεπτά σε 3.000 x g, και πλύνετε το σωματιδιακό/ίζηματικό υλικό με απεσταγμένο/υπερκαθαρό νερό. Επαναλάβετε μία ή δύο φορές, αφού βεβαιωθείτε ότι το ίζημα έχει επανεναιωρηθεί πλήρως μεταξύ των πλύσεων.
2. Υποβάλετε εκ νέου σε εναιώρηση το τελικό ίζημα με μια μικρή ποσότητα απεσταγμένου/υπερκαθαρού νερού, έτσι που η πυκνότητα του υλικού να μην είναι υπερβολική, και στροβιλίστε.
3. Απλώστε 10-20 μL πάνω από όλη την περιοχή μιας ή περισσοτέρων υποδοχών στο πλακάκι με το δείγμα του ασθενούς. Προχωρήστε σε εξάτμιση μέχρι να επέλθει ξήρανση στους 37° C. Αν υπάρχει διαθέσιμη Cytospin (π.χ.. Cytospin 2), στροβιλίστε 0,4 έως 0,5 mL BAL ή IS στις 900 rpm, χρησιμοποιώντας ένα λευκό και ένα ανοικτό καφέ φίλτρο.
4. Σταθεροποιήστε τα δείγματα επιστρώνοντας 1-2 σταγόνες ακετόνης Analar (ή αντίστοιχης ποιότητας). Αφήστε να λάβει χώρα εξάτμιση σε θερμοκρασία δωματίου.
5. **Εκπλύνετε τα παρασκευάσματα Cytospin με άφθονο απεσταγμένο/υπερκαθαρό νερό για να αφαιρέσετε τα άλατα από το δείγμα, διότι μειώνουν την αποτελεσματικότητα της ενζυμικής αποσύνθεσης.**
6. Στεγνώστε τα πλακάκια στον αέρα.
7. **Αραιώστε** το ανασυσταθέν ένζυμο σε αναλογία **1 προς 10 (1+9) με αραιωτικό ενζύμου**. Αραιώστε μόνο όσο ανασυσταθέν ένζυμο χρειάζεται για τις άμεσες απαιτήσεις.
8. Επιστρώστε τα στεγνά και τα σταθεροποιημένα δείγματα με **20 μL** αραιωμένου ενζύμου. Βεβαιωθείτε ότι όλη η περιοχή της πλάκας έχει καλυφθεί από το αντιδραστήριο.
9. Επώαστε τα πλακάκια για 30 λεπτά ΑΚΡΙΒΩΣ σε υγροποιημένο θάλαμο ρυθμισμένο στους 37° C. Θα προκύψει υπερβολική αποσύνθεση των ωκόυστων, αν η επώαση συνεχιστεί περισσότερο από 30 λεπτά. Οι ωκόυστες ενδέχεται να γίνουν λιγότερο χαρακτηριστικές και να μειωθεί η δυνατότητα άμεσης αναγνώρισής τους.
10. Εκπλύνετε τα πλακάκια ρίχνοντας άφθονο απεσταγμένο/υπερκαθαρό νερό πάνω από την επιφάνεια των υποδοχών. Μην κατευθύνετε τον πίδακα του νερού ακριβώς πάνω στο δείγμα.
11. Καθαρίστε με απορροφητικό χαρτί τα πλακάκια και στεγνώστε τα στον αέρα.
12. Προσθέστε **15 μL** αντισώματος αντι-*P. carinii* στα δείγματα. Βεβαιωθείτε ότι όλη η περιοχή της πλάκας έχει καλυφθεί από το αντιδραστήριο. Επώαστε σε υγροποιημένο θάλαμο επί 15 λεπτά στους 37° C.
13. Εκπλύνετε τις υποδοχές όπως περιγράφεται στο βήμα 10, καθαρίστε με απορροφητικό χαρτί και στεγνώστε στον αέρα.

14. Προσθέστε στα δείγματα **15 µL** αντισώματος αντι-ποντικού συζευγμένου με FITC. Βεβαιωθείτε ότι όλη η περιοχή της πλάκας έχει καλυφθεί από το αντιδραστήριο. Επλώστε σε υγροποιημένο θάλαμο επί 15 λεπτά στους 37° C.
15. Εκπλύνετε τις υποδοχές, καθαρίστε με απορροφητικό χαρτί και αφήστε τις να στεγνώσουν στον αέρα.
16. Βάλτε μια σταγόνα από το μέσο στερέωσης πάνω σε κάθε υποδοχή που είναι εν χρήση και τοποθετήστε καλυπτρίδα κατάλληλου μεγέθους. Αναποδογυρίστε το πλακάκι πάνω σε απορροφητικό πανί και πιέστε απαλά για να απομακρυνθεί το επιπλέον μέσο στερέωσης και οι φυσαλίδες αέρα.
17. Εξετάστε τα δείγματα για να δείτε αν υπάρχουν ωκύστες έντονου ή μετρίως έντονου χρώματος πράσινου μήλου, οι οποίες μπορεί να είναι σημασμένες με όμοιο ή ανόμοιο τρόπο. Τα κυτταρικά υπολείμματα και άλλα υλικά μπορούν να υποβληθούν σε αντίθετη χρώση με Evans Blue, που θα δώσει φθορίζον κόκκινο χρώμα. Εξετάστε όλη την περιοχή του δείγματος.

Ε Ρ Μ Η Ν Ε Ι Α Τ Ω Ν Α Π Ο Τ Ε Λ Ε Σ Μ Α Τ Ω Ν

ΘΕΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ - Πέντε ή περισσότερες φθορίζουσες ωκύστες πάνω σε ολόκληρο το πλακάκι.

ΑΜΦΙΒΟΛΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ - Μία έως πέντε φθορίζουσες ωκύστες.

ΑΡΝΗΤΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ - Καμία φθορίζουσα ωκύστη. Αν εξακολουθεί να υπάρχει υποψία για μόλυνση από την *P. carinii*, επαναλάβετε τον προσδιορισμό με βαρύτερο ενοφθάλμισμα.

Δ Ε Δ Ο Μ Ε Ν Α Α Π Ο Δ Ο Σ Η Σ

ΚΕΝΤΡΟ 1¹⁰

223 δείγματα BAL και IS από ασθενείς με HIV με συμπτώματα στην αναπνευστική οδό αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν με τροποποιημένη χρώση Grocott. Συνολική συμφωνία = 90,6%.

Από τα 21 (9,4%) αποτελέσματα που δε συμφωνούσαν, ελήφθησαν έξι επόμενα δείγματα και πέντε από τα έξι αποτελέσματα ήταν θετικά και με τις δύο εξετάσεις.

ΚΕΝΤΡΟ 2⁸

135 δείγματα IS αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν με χρώση Grocott. Συνολική συμφωνία = 88,9%.

Δεκαπέντε αποτελέσματα (11,1%) ήταν θετικά/αμφίβολα με τον προσδιορισμό Detect IF *P. carinii* και αρνητικά με τη χρώση Grocott. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αυτό υποδηλώνει αυξημένη ευαισθησία για την *P. carinii* στα κυτταρολογικά παρασκευάσματα των μηχανικώς προκαλούμενων πτυέλων (IS) με την τεχνική του ανοσοφθορισμού σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους χρώσης.

ΚΕΝΤΡΟ 3⁹

254 δείγματα BAL και IS από 75 ασθενείς με AIDS, άλλους ανοσοκατασταλμένους ασθενείς, μεταξύ των οποίων και ασθενείς που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση, και ασθενείς με διάγνωση 'άτυπης πνευμονίας' αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν με χρώση Grocott. Συνολική συμφωνία = 94,1%.

Δεκαπέντε αποτελέσματα (5,9%) ήταν θετικά/αμφίβολα με τον προσδιορισμό Detect IF *P. carinii* και αρνητικά με τη χρώση Grocott. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η εξέταση Detect IF ήταν πιο αξιόπιστη και ευαίσθητη από την τεχνική Grocott.

ΚΕΝΤΡΟ 4⁶

50 δείγματα BAL και 50 δείγματα IS εξετάστηκαν για μόλυνση από την *P. carinii* με χρήση έμμεσου ανοσοφθορισμού, άμεσου ανοσοφθορισμού, τροποποιημένης χρώσης Wright-Giemsa και τροποποιημένης χρώσης αργύρου. Ως θετικό δείγμα ορίστηκε το επίχρισμα που ήταν θετικό με δύο ή περισσότερες μεθόδους.

Χρησιμοποιώντας αυτόν τον ορισμό, η ευαισθησία και η ειδικότητα του προσδιορισμού DETECT IF *P. carinii* είχαν ως εξής.

BAL	Ευαισθησία = 86%	Ειδικότητα = 100%
IS	Ευαισθησία = 97%	Ειδικότητα = 100%

ΚΕΝΤΡΟ 5

152 δείγματα BAL από ασθενείς με HIV με κλινικές ενδείξεις πνευμονίας από *P. carinii* αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν με χρώση Grocott. Τα αποτελέσματα για κάθε μέθοδο συγκρίθηκαν με τις κλινικές ενδείξεις για πνευμονία από *P. carinii* (PCP). Σε πέντε περιπτώσεις, το αποτέλεσμα των κλινικών ενδείξεων ήταν αμφίβολο. Στις τέσσερις περιπτώσεις το αποτέλεσμα ήταν θετικό με τον προσδιορισμό Detect IF και αρνητικό με τη χρώση Grocott και σε μία περίπτωση το αποτέλεσμα ήταν θετικό με τη χρώση Grocott και αρνητικό με τον Detect IF.

Συνολική συμφωνία του DETECT IF με κλινικές ενδείξεις για PCP = $\frac{146}{147} = 99,3\%$ (ένα αποτέλεσμα ήταν αμφίβολο με τον προσδιορισμό IF)

Συνολική συμφωνία της χρώσης Grocott με κλινικές ενδείξεις για PCP = $\frac{140}{147} = 95,2\%$

Συνολική συμφωνία του DETECT IF με τη χρώση Grocott = 94,5%

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΧΡΗΣΗΣ

1. Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την πιθανότητα μόλυνσης από την *P. carinii*. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται υπό το φως όλων των κλινικών και διαγνωστικών πληροφοριών. Αν είναι απαραίτητο, πάρτε κι άλλο δείγμα.
2. Υπερβολική ποσότητα βλέννας στα δείγματα ενδέχεται να εμποδίσει την επαρκή χρώση.
3. Το συζευγμένο με φλουορεσκεΐνη (FITC) αντίσωμα αντί-ποντικίου έχει δυνατότητα αλληλο-αντίδρασης με το *Candida albicans* όταν υπάρχει σε δείγματα του ασθενούς, κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων ως ψευδή θετικά αποτελέσματα.¹⁵

REFERENCES
REFERENCES / REFERENCIAS / VERWEISE
BIBLIOGRAPHIA / BIBLIOGRAFIA / REFERENCER
REFERENSER / ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Curry A, Turner AJ, Lucas S. Opportunistic Protozoan Infections in Immunodeficiency Virus Disease: Review Highlighting Diagnostic and Therapeutic Aspects. *J Clin Path*, **44**, 182-193, 1991.
2. Kovacs JA et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Improved Detection in Sputum with use of Monoclonal Antibodies. *The New Eng J Med*, March 10 1988, **318** No. 10, 499-593.
3. Posner D, Khan FA. Respiratory Infections in AIDS. A Comprehensive Care Approach. *J Respir Dis*, **June** 1987, 83-94.
4. Broaddus CM et al. Bronchoalveolar Lavage and Transbronchial Biopsy for the Diagnosis of Pulmonary Infections in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Ann Intern Med*, **102**, 747-752, 1985.
5. Mills J. *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma Gondii* Infections in Patients with AIDS. *Rev Infect Dis*, **8**, 1001-1011.
6. Cregan P et al. Comparison of Four Methods for the Rapid Detection of *Pneumocystis carinii* in Respiratory Systems. *J Clin Microb*, **28** No. 11, 2432-2436, 1990
7. Dournon E et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by non-experts. *The Lancet*, **Jan 14** 1989, 107-108.
8. Midgley J et al. Increased Sensitivity of Immunofluorescence for the Detection of *Pneumocystis carinii*. *The Lancet*, **Dec 23/30** 1989, 1523.
9. Magee JG et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia: Detection of Parasites by Immunofluorescence Based on a Monoclonal Antibody. *Medical Laboratory Sciences*, **48**, 235-237, 1991.
10. Midgley J et al. Monoclonal Immunofluorescence Compared with Silver Stain for Investigating *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Path*, **44**, 75-76, 1991.
11. Gill VJ et al. Detection of *Pneumocystis carinii* by Fluorescent-Antibody Stain Using a Combination of Three Monoclonal Antibodies. *J Clin Microbiol*. **25 No. 10**, 1837-1840, 1987.
12. Datry A., Rozenbaum W., Rosenheim M., Danis M., Duflo B. et Gentilini M. - Parasitoses Opportunistes et SIDA. Méthodes de diagnostic. *Feuil. Biol.*, 1985, **XXVI**, 41-46.
13. Petithory J.C., Derouin F., Ardoin F. - Les parasitoses dans le SIDA. Rev. Franç. Lab., Suppl : 15 ème Congrès National des Biologistes des Hôpitaux Généraux, Port Barcarès, **Sept.** 21-36, 1986.
14. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, January, 2007.
15. Koch M & Heizmann W. Problems in the Detection of *Pneumocystis carinii* by Indirect Immunofluorescence. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis*, **1**, 58-59, 1990



IVD

For in vitro diagnostic use / Pour diagnostic in vitro / Para uso diagnostico in vitro / In Vitro Diagnosticum / Per uso diagnostico in vitro / Para utilizar no diagnóstico *in vitro* / Kun for in vitro diagnostik / För diagnostisk användning in vitro / Για διαγνωστική χρήση in vitro

REF

Catalogue number / Numero catalogue / Numero de catalogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Número de catálogo Bestillingsnummer / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου

LOT

Lot / Lot / Lote / Ch.-B. / Lotto Lote / Parti / Lot / Παρτίδα

REAG A

Reagent A – F / Réactif A - F / Reactivo A – F / Reagenz A – F / Reagente A – F / Um reagente A – F / Reagent A – F / Reagens A- F / Αντιδραστήριο A - ΣΤ

REAG F

SPCM SLD

Specimen Slide / Lames pour échantillons patients / Platinas con muestras del paciente/ Patientenproben / Vetrini per campioni / Lâminas de amostras dos doentes / Patientprøveobjektglas / Objektglas för patientprov / Πλακάκια δειγμάτων ασθενών



60 tests / 60 determinations / 60 pruebas / 60 Bestimmungen / 60 tests / 60 testes / 60 tests / 60 tester / 60 προσδιορισμοί



Protect from light / Protéger de la lumière / Proteger de la luz / Vor Licht schützen / Riparo dalla luce / Proteger da luz / Beskyt mod lys / skyddas mot ljus / Προστατέψτε από το φως



See instructions for use / Voir les consignes d'utilisation / Ver las instrucciones de uso / Gebrauchsinformation beachten / Vedere le istruzioni per l'uso / Ver as instruções de utilização / Se brugsvejledningen / Se instruktioner för användning / Δείτε τις Οδηγίες χρήσης



Use by / Utiliser avant / Utilizar antes de / Verwendbar bis / Scadenza / Utilizar antes de / Brug før / Använd före / Ημερομ. Λήξης



Store at 2-8°C / Conserver a 2-8°C / Conservar a 2-8°C / Lagerung bei 2-8°C / Conservare a 2-8°C / Armazenar entre 2 e 8°C / Opbevar ved 2-8°C / Förvara vid 2-8°C / Φυλάσσετε στους 2 -8° C



Manufactured by / Fabrique par / Fabricado por / Hergestellt von / Prodotto da / Fabricado por / Fremstillet af / Tillverkad av / Κατασκευάζεται από την



Axis-Shield Diagnostics Limited

The Technology Park, Dundee DD2 1XA, United Kingdom.

Tel: +44 (0) 1382 422000, Fax: +44 (0) 1382 422088.

E-mail: shield@uk.axis-shield.com

Website: www.axis-shield.com