

BD BBL™ Calcofluor White Reagent Droppers

English: pages 1 – 2 Italiano: pagine 6 – 8
Français : pages 3 – 4 Español: páginas 8 – 9
Deutsch: Seiten 4 – 6

 L001206(03)
2016-06

Contact your local BD representative for instructions. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Pokyny vám poskytne místní zástupce společnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Ota yhteys lähimpään BD:n edustajaan ohjeiden saamiseksi. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Нұсқаулар үшін жергілікті BD өкілімен хабарласыңыз. / Lai saņemtu norādījumus, sazinieties ar vietējo BD pārstāvi. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Neem contact op met uw plaatselijke BD-vertegenwoordiger voor instructies. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o reprezentante local da BD para instruções. / Pentru instrucțiuni, contactați reprezentantul local BD. / Для получения указаний обратитесь к местному представителю компании BD. / Instrukcie získate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Kontakta närmaste BD-representant för anvisningar. / Talimatlar için yerel BD temsilcinizle temasa geçin. / За инструкции зверніться до місцевого представника компанії BD.

INTENDED USE

BD BBL™ Calcofluor White Reagent Droppers are used in the rapid fluorescent microscopic detection of fungi in direct smears.

SUMMARY AND EXPLANATION

Calcofluor white is a nonspecific fluorochrome stain that binds to fungi and, depending upon the filter system employed, fluoresces either an apple green or blue white color when exposed to light of the appropriate wavelength.¹ It may be used on fresh, frozen, fixed, paraffin-embedded, and clinical specimens.² It has been reported that calcofluor white can be used in the detection of parasitic *Pneumocystis jiroveci* (formerly *Pneumocystis carinii*)³ and other opportunistic fungal organisms in bronchoalveolar lavage (BAL) specimens and aspirates from immunosuppressed individuals.^{4,5}

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Calcofluor white is a disodium salt of 4,4'-bis-[4-anilino-bis-diethylamino-5-triazin-2-ylamino]-2,2'-stilbene-disulfonic acid, a colorless dye that is used in the textile and paper industry as a whitening agent. It has the ability to bind to β 1-3, β 1-4 polysaccharides (i.e., cellulose and chitin), and exhibits fluorescence when exposed to long-wavelength ultraviolet and short-wavelength visible light. It has been used as a biological marker to stain the cell wall of plants, and is therefore valuable in delineating fungal elements.⁶

REAGENTS

Calcofluor White Reagent Droppers contain 0.5 mL of a 0.05% solution of calcofluor white in distilled water.

Warnings and Precautions:

For *in vitro* Diagnostic Use.

Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"⁷⁻¹⁰ and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids. Prior to discarding, specimen containers and other contaminated materials must be sterilized by autoclaving.

Storage Instructions: Store at room temperature 15 – 30 °C (59 – 85 °F). Protect from light.

Product Deterioration: This reagent is hermetically sealed in an ampule, which affords protection of the solution from chemical instability until the expiration date. The staining solution should be clear with a slight green tint. Do not use if a heavy white precipitate is evident. Each dropper is good for one day's use after ampule has been broken. Do not use after the expiration date.

PROCEDURE

Material Provided: Calcofluor White Reagent Droppers. Each dropper contains sufficient reagent to stain one slide.

Materials Required But Not Provided: Ancillary culture media, reagents, 10% Potassium Hydroxide Reagent Dropper, Cat. No. 261191, quality control organisms, a fluorescent microscope and other laboratory equipment as required for this procedure.

Test Procedure:

GENERAL SPECIMENS (hair, nails, skin, other tissue, culture, etc.)

1. Slides used should be clean and free of oils and debris.
2. Prepare a smear of the specimen to be stained.
3. Add 1 to 2 drops of a 10% potassium hydroxide solution and gently mix to spread.
4. Hold Calcofluor White Reagent dropper upright and **POINT TIP AWAY FROM YOURSELF**. Grasp the middle with thumb and forefinger and squeeze gently to break ampule inside the dropper. **Caution: Break ampule close to its center one time only. Do not manipulate the dropper any further as the plastic may puncture and injury may occur.** Tap the bottom of the dropper on the tabletop a few times. Invert for convenient drop-by-drop dispensing of the reagent.
5. Add 1 to 2 drops of Calcofluor White Reagent. Wait for 1 to 2 min.
6. Mount specimen with a cover slip.
7. Using a fluorescent microscope, examine smears initially at 10X, then confirm findings at a higher magnification.
8. Tissue sections showing fungi can be rinsed in distilled water and restained with periodic acid-Schiff stain or by the Gomori methenamine silver (GMS) technique.⁶

ASPIRATE OR BRONCHOALVEOLAR LAVAGE (BAL) SPECIMENS

1. Slides used should be clean and free of oils and debris.
2. Specimens may be fresh or centrifuged and resuspended to the appropriate concentration in Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4.
3. Mark off a well-defined square on the slide with a wax marking pencil.
4. Apply the specimen to the area within the wax square on the slide; allow to air dry.
5. Cover the area within the square with 100% methanol; allow to air dry.
6. Add sufficient 10% potassium hydroxide solution to just cover the specimen. Do not saturate. Wait for 5 s.

7. Hold Calcofluor White Reagent dropper upright and **POINT TIP AWAY FROM YOURSELF**. Grasp the middle with thumb and forefinger and squeeze gently to break ampule inside the dropper. **Caution: Break ampule close to its center *one time only*. Do not manipulate the dropper any further as the plastic may puncture and injury may occur.** Tap the bottom of the dropper on the tabletop a few times. Invert for convenient drop-by-drop dispensing of the reagent.
8. Add 1 to 2 drops of Calcofluor White Reagent to the area within the square. Wait for 2 min.
9. Drain excess Calcofluor White Reagent from the slide.
10. Using a fluorescent microscope view the specimen:
 - a. To view as a wet mount slide, add Calcofluor White Reagent, as needed, a cover slip and view with appropriate objective.
 - or -
 - b. To view under oil immersion, after air-drying, view directly.

User Quality Control:

1. Examine the staining solution for signs of deterioration (see "Product Deterioration").
2. Check the performance of the stain with fresh cultures of *Candida albicans* ATCC™ 10231 (positive) and *Escherichia coli* ATCC 25922 (negative).

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent CLSI guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

RESULTS

When exposed to light of the suggested wavelength (300 – 412 nm), fungi will fluoresce a bright apple green or blue white color. Bacteria will fluoresce weakly or not at all.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Many clinical laboratories now use fluorescence microscopy for the examination of other stains. For best results with Calcofluor White Reagent, a mercury vapor rather than a quartz halogen lamp, and UV/BV excitation are recommended.¹ Microscopes fitted with selective filters for the excitation of fluorescein (KP490 interference filter) are not recommended since these filters prevent the proper wave length from striking the specimen.¹

Certain debris may fluoresce and should be distinguished from fungal elements on the basis of morphology.

Calcofluor White Reagent Droppers are used for the presumptive identification of fungi. All positive smears should be confirmed by culture.

Although the cells themselves of *Cryptococcus* will stain with calcofluor white, it has been reported that the capsule will not; further testing for confirmation is recommended.

Bacteria may fluoresce, although to a lesser degree than fungi and may be confused with calcofluor white-stained artifacts. The presence of fungi should be determined on the basis of morphology.

Fluorescent staining intensity may vary depending on the organism being stained.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

BD conducted a study of the **BD BBL™** Calcofluor White Reagent using the following organisms:

<i>Aspergillus</i> sp. (ATCC 36607)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
<i>Candida guilliermondii</i> (ATCC 14242)	<i>Cladosporium</i> sp. (ATCC 13026)
<i>Microsporium canis</i> (ATCC 10214)	<i>Penicillium roquefortii</i> (ATCC 9295)
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)	

All slides were prepared in triplicate with the wet mount method as described in the "GENERAL SPECIMENS" section of the Test Procedure (including the use of 10% potassium hydroxide reagent). There was one high positive control slide (cellulose via cotton fibers) and two negative control slides (*Escherichia coli* ATCC 25922 and an uninoculated slide).

Slides were examined with a fluorescence microscope (Olympus, BH-2) equipped with a 100w mercury lamp, exciter filter (490 nm) and barrier filter (545 nm).

The organisms evaluated in this study exhibited appropriate fluorescent staining characteristics.

AVAILABILITY

Cat. No. Description

261195	BD BBL™ Calcofluor White Reagent Droppers, 50.
261191	BD BBL™ 10% Potassium Hydroxide Reagent Droppers, 50.

REFERENCES

1. Harrington, B.J., and G.J. Hageage, Jr. 1991. Calcofluor white: tips for improving its use. Clin. Microbiol. Newsl. 13:3-5.
2. Monheit, J.E., D.F. Cowan, and D.G. Moore. 1984. Rapid detection of fungi in tissues using calcofluor white and fluorescence microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med. 108:616-618.
3. Stringer, J.R., C.B. Beard, R.F. Miller, and A.E. Wakefield. 2002. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg. Infect. Dis. 8(9):891-6.
4. Baselski, V.S., M.K. Robinson, L.W. Pifer, and D.R. Woods. 1990. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using Cellufluor staining. J. Clin. Microbiol. 28:393-394.
5. Kim, Y.K., S. Parulekar, P.K.W. Yu, R.J. Pisani, T.F. Smith, and J.P. Anhalt. 1990. Evaluation of calcofluor white stain for detection of *Pneumocystis carinii*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 13:307-310.
6. Hageage, G.J., and B.J. Harrington. 1984. Use of calcofluor white in clinical mycology. Lab. Med. 15:109-112.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
8. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. 17:53-80.
9. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
10. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EECP). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.

Technical Information: In the United States contact BD Technical Service and Support at 800-638-8663 or www.bd.com/ds.

APPLICATION

BD BBL Calcofluor White Reagent Droppers (compte-gouttes de réactif au calcofluor blanc) servent à la détection rapide en microscopie fluorescente de champignons dans des frottis directs.

RESUME ET EXPLICATION

Le calcofluor blanc est un fluorochrome colorant non spécifique qui se lie aux champignons et suivant le système de filtres employé, émet une fluorescence de couleur vert pomme ou bleu blanc lorsqu'il est exposé à une lumière de la longueur d'onde appropriée.¹ Il peut être utilisé sur des échantillons frais, congelés, fixés, inclus dans la paraffine et cliniques.² Il a été rapporté que le calcofluor blanc peut être utilisé pour la détection de parasites *Pneumocystis jiroveci* (anciennement *Pneumocystis carinii*)³ et d'autres champignons opportunistes dans les échantillons de lavage broncho-alvéolaire (BAL) et les aspirats d'individus immunodéprimés.^{4,5}

PRINCIPES DE LA METHODE

Le calcofluor blanc est un sel disodique de l'acide 4,4'-bis-[4-anilino-bis-diéthylamino-5-triazine-2-ylamino]-2,2'-stilbène-disulfonique, un colorant incolore qui est utilisé dans l'industrie textile et papetière comme agent de blanchiment. Il a la propriété de se lier aux polysaccharides β 1-3 et β 1-4 (par ex., cellulose et chitine) et présente une fluorescence lorsqu'il est exposé aux longues longueurs d'onde ultraviolettes et aux courtes longueurs d'ondes du spectre visible. Il a servi de marqueur biologique pour colorer les parois cellulaires végétales et est par conséquent particulièrement utile pour délimiter les contours des éléments fongiques.⁶

REACTIFS

Les Calcofluor White Reagent Droppers contiennent 0,5 mL d'une solution à 0,05 % de calcofluor blanc dans de l'eau distillée.

Avertissements et précautions :

Pour usage diagnostique *in vitro*.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les "Précautions standard"⁷⁻¹⁰ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Stériliser à l'autoclave les récipients contenant les échantillons et les autres matériaux contaminés avant de les éliminer.

Instructions pour la conservation : Conserver à température ambiante de 15 à 30 °C et à l'abri de la lumière.

Détérioration du produit : Ce réactif est hermétiquement scellé dans une ampoule assurant la protection contre l'instabilité chimique de la solution jusqu'à la date de péremption. La solution colorante devrait être claire avec une légère teinte verte. Ne pas utiliser si un épais précipité blanc est présent. Chaque compte-gouttes reste bon à utiliser pendant 24 h une fois l'ampoule brisée. Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

METHODE

Matériaux fournis : Calcofluor White Reagent Droppers. Chaque compte-gouttes contient suffisamment de réactif pour colorer une lame.

Matériaux requis mais non fournis : Milieux de culture auxiliaires, réactifs, 10 % Potassium Hydroxide Reagent Dropper, Cat. N° 261191, souches de contrôle de qualité, microscope à fluorescence et autres équipements de laboratoire comme requis par cette procédure.

Mode opératoire du test :

ECHANTILLONS GENERAUX (cheveux, ongles, peau, autres tissus, culture, etc.)

1. Les lames utilisées doivent être propres et exemptes de graisses et de débris.
2. Préparer un frottis de l'échantillon à colorer.
3. Ajouter 1 à 2 gouttes d'une solution à 10 % d'hydroxyde de potassium et mélanger doucement pour étaler.
4. Tenir le Calcofluor White Reagent dropper verticalement et **POINTER L'EXTREMITE A L'OPPOSE DE SOI**. Saisir le milieu entre le pouce et l'index et presser doucement afin de casser l'ampoule à l'intérieur du compte-gouttes. Attention : Briser l'ampoule en son centre une fois seulement. Ne pas manipuler davantage le compte-gouttes pour ne pas risquer de perforer le plastique et de se blesser. Tapoter plusieurs fois le fond du compte-gouttes sur la paillasse. Renverser le compte-gouttes pour que le réactif s'écoule goutte à goutte.
5. Ajouter 1 à 2 gouttes de Calcofluor White Reagent (réactif au calcofluor blanc). Attendre 1 à 2 min.
6. Monter l'échantillon sur la lame avec une lamelle.
7. Au moyen d'un microscope à fluorescence, examiner le frottis d'abord au grossissement 10X puis confirmer les résultats au plus fort grossissement.
8. Les sections de tissus présentant des champignons peuvent être rincées à l'eau distillée et re-colorées avec l'acide périodique de Schiff ou grâce à la technique à la méthénamine d'argent de Gomori (GMS).⁶

ECHANTILLONS D'ASPIRAT OU DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE (BAL)

1. Les lames utilisées doivent être propres et exemptes de graisses et de débris.
2. Les échantillons peuvent être frais ou centrifugés et remis en suspension à la concentration correcte dans du sérum physiologique tamponné au phosphate (PBS), pH 7,4.
3. Marquer un carré bien défini sur la lame avec un crayon marqueur à la cire.
4. Appliquer l'échantillon sur la surface à l'intérieur du carré tracé à la cire sur la lame et laisser sécher à l'air.
5. Recouvrir la surface à l'intérieur du carré avec du méthanol pur (100 %) et laisser sécher à l'air.
6. Ajouter une quantité suffisante de solution à 10 % d'hydroxyde de potassium pour couvrir l'échantillon. Ne pas saturer. Attendre 5 sec.
7. Tenir le Calcofluor White Reagent dropper verticalement et **POINTER L'EXTREMITE A L'OPPOSE DE SOI**. Saisir le milieu entre le pouce et l'index et presser doucement afin de casser l'ampoule à l'intérieur du compte-gouttes. **Attention : Briser l'ampoule en son centre une fois seulement. Ne pas manipuler davantage le compte-gouttes pour ne pas risquer de perforer le plastique et de se blesser.** Tapoter plusieurs fois le fond du compte-gouttes sur la paillasse. Renverser le compte-gouttes pour que le réactif s'écoule goutte à goutte.
8. Ajouter 1 à 2 gouttes de réactif au calcofluor blanc sur la surface à l'intérieur du carré. Attendre 2 min.
9. Drainer l'excédent de réactif au calcofluor blanc de la lame.
10. Examiner l'échantillon avec un microscope à fluorescence.

- a. Pour examiner un montage humide sur lame, ajouter du réactif au calcofluor blanc, comme requis, poser une lamelle et observer avec l'objectif adéquat.

- ou -

- b. Examiner avec l'objectif à l'huile d'immersion, après le séchage à l'air, observer directement.

Contrôle de qualité par l'utilisateur :

1. Inspecter la solution colorante pour vérifier l'absence de traces de détérioration (voir "Détérioration du produit").
2. Vérifier les performances du colorant avec des cultures fraîches de *Candida albicans* ATCC 10231 (positif) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (négatif).

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA correspondantes pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

RESULTATS

Lorsque exposé à la lumière de la longueur d'onde suggérée (300 - 412 nm), les champignons émettront une fluorescence de couleur vert pomme brillant ou bleu-blanc. Les bactéries ne fluoresceront que faiblement ou pas du tout.

LIMITES DE LA PROCEDURE

De nombreux laboratoires d'analyses utilisent désormais la microscopie à fluorescence pour examiner d'autres colorations. Pour obtenir les meilleurs résultats avec le réactif au calcofluor blanc, une lampe à vapeur de mercure plutôt qu'une lampe quartz-halogène et une excitation UV/BV sont recommandées.¹ Les microscopes équipés de filtres sélectifs propres à l'excitation de la fluorescéine (filtre d'interférence KP490) sont déconseillés parce que ces filtres empêchent la longueur d'onde adéquate de frapper (exciter) l'échantillon.¹

Certains débris peuvent fluorescer et doivent être différencier des éléments fongiques en se basant sur la morphologie.

Les Calcofluor White Reagent Droppers servent à l'identification présomptive de champignons. Tous les frottis positifs doivent être confirmés par la culture.

Bien que les cellules elles-mêmes de *Cryptococcus* se coloreront avec le calcofluor blanc, la capsule ne se colorerait pas d'après certains rapports ; par conséquent des tests supplémentaires de confirmation sont recommandés.

Les bactéries peuvent fluorescer quoique à un degré moindre que les champignons et elles peuvent être confondues avec certains artéfacts colorés par le calcofluor blanc. La présence de champignons doit toujours être établie sur la base de la morphologie.

L'intensité de la coloration fluorescente peut varier en fonction de l'organisme coloré.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

BD a effectué une étude du **BD BBL Calcofluor White Reagent** au moyen des organismes suivants :

<i>Aspergillus</i> sp. (ATCC 36607)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
<i>Candida guilliermondii</i> (ATCC 14242)	<i>Cladosporium</i> sp. (ATCC 13026)
<i>Microsporum canis</i> (ATCC 10214)	<i>Penicillium roquefortii</i> (ATCC 9295)
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)	

Toutes les lames ont été préparées en triple exemplaire selon la méthode de montage humide décrite dans la section "ECHANTILLONS GENERAUX" du Mode opératoire du test (incluant l'emploi du réactif à 10 % d'hydroxyde de potassium). Il y avait une lame de contrôle hautement positive (cellulose de fibres de coton) et deux lames de contrôle négatives (*Escherichia coli* ATCC 25922 et une lame non inoculée).

Les lames ont été examinées avec un microscope à fluorescence (Olympus, BH-2) équipé d'une lampe au mercure de 100 w, d'un filtre d'excitation (490 nm) et d'un filtre d'émission (d'arrêt) (545 nm).

Les organismes utilisés dans cette étude ont montré les caractéristiques de coloration fluorescente appropriées.

CONDITIONNEMENT

No réf. Description

261195 **BD BBL Calcofluor White Reagent Droppers**, 50.

261191 **BD BBL 10% Potassium Hydroxide Reagent Droppers**, 50.

REFERENCES: voir la rubrique "References" du texte anglais.

Service et assistance technique de BD Diagnostics : contacter votre représentant local de BD.

BD BBL Calcofluor White Reagent Droppers

Deutsch

VERWENDUNGSZWECK

BD BBL Calcofluor White Reagent Droppers (**BD BBL Calcofluor White-Reagenz-Tropfpipetten**) werden bei der schnellen fluoreszenzmikroskopischen Identifizierung von Pilzen in direkten Abstrichen verwendet.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Calcofluor White ist ein nicht spezifischer fluorchromer Stamm, der an Pilze bindet und, je nach verwendetem Filtersystem, bei Einwirkung von Licht der entsprechenden Wellenlänge entweder apfelgrün oder blauweiß fluoresziert.¹ Es kann auf frischen, gefrorenen, fixierten, paraffineingebetteten und klinischen Proben eingesetzt werden.² Berichten zufolge kann Calcofluor White zum Nachweis von parasitischem *Pneumocystis jiroveci* (ehemals *Pneumocystis carinii*)³ sowie von anderen opportunistischen Pilzorganismen in bronchoalveolären Spülungen (BAL) und Aspiraten aus immunsupprimierten Individuen dienen.^{4,5}

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Calcofluor white ist ein Dinatrium-Salz der 4,4'-Bis-[4-anilino-bis-diethylamino-5-triazin-2-ylamino]-2,2'-stilben-disulfonsäure, ein farbloser Farbstoff, der in der Textil- und Papierindustrie als Weißmacher verwendet wird. Es kann an β 1-3, β 1-4 Polysaccharide binden (z. B. Cellulose und Chitin) und fluoresziert, wenn es langwelligem ultravioletten und kurzwelligem sichtbaren Licht ausgesetzt wird. Es wurde als biologischer Marker bei der Färbung von Pflanzenzellwänden eingesetzt und ist daher bei der Umreifung von Pilzstrukturen nützlich.⁶

REAGENZIEN

Calcofluor White Reagent Droppers enthalten 0,5 mL einer 0,05 % Lösung von Calcofluor White in destilliertem Wasser.

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

In-vitro-Diagnostikum.

Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, darunter auch Hepatitis-Viren und HIV enthalten. Beim Umgang mit allen durch Blut oder andere Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die "Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen"⁷⁻¹⁰ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Vor der Entsorgung müssen Probenbehälter und andere kontaminierte Materialien im Autoklaven sterilisiert werden.

Aufbewahrung: Bei Raumtemperatur (15–30 °C) lagern. Vor Licht geschützt aufbewahren.

Produktverfall: Dieses Reagenz ist in einer Ampulle hermetisch versiegelt, wodurch die Lösung bis zum Verfallsdatum vor chemischer Instabilität geschützt wird. Die Färbelösung muss klar und leicht grün gefärbt sein. Bei Anwesenheit eines dicken weißen Niederschlags nicht verwenden. Jede Tropfpipette kann nach Aufbrechen der Ampulle einen Tag lang verwendet werden. Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht benutzen.

VERFAHREN

Mitgeliefertes Material: Calcofluor White Reagent Droppers. Jede Tropfpipette enthält ausreichend Reagenz für die Anfärbung eines Objektträgers.

Benötigte, aber nicht mitgelieferte Materialien: Hilfskulturmedien, Reagenzien, 10 % Potassium Hydroxide Reagent Dropper (10 % Kaliumhydroxidreagenz-Tropfpipetten) Kat. Nr. 261191, Qualitätskontrollorganismen, ein Fluoreszenzmikroskop und weitere Laborausstattung, die für dieses Verfahren benötigt wird.

Testverfahren:

ALLGEMEINE PROBEN (Haare, Nägel, Haut, andere Gewebe, Kultur usw.)

1. Die benutzten Objektträger müssen sauber und fettfrei sein und dürfen keine Fremdkörper enthalten.
2. Fertigen Sie einen Abstrich der zu färbenden Probe an.
3. 1 bis 2 Tropfen einer 10 % Kaliumhydroxidlösung zufügen und vorsichtig vermischen und austreichen.
4. Calcofluor White Reagent dropper aufrecht halten und **DIE SPITZE VOM KÖRPER WEG RICHTEN**. Die Mitte mit Daumen und Zeigefinger ergreifen und vorsichtig zusammendrücken, um die Ampulle in der Tropfpipette aufzubrechen. **Vorsicht: Die Ampulle nur ein einziges Mal in der Nähe der Mitte brechen. Die Pipette nicht weiter handhaben, da das Plastik durchgestochen werden kann und Verletzungen möglich sind.** Mit dem Boden der Pipette einige Male leicht auf die Tischoberfläche klopfen. Für eine komfortable tropfenweise Dispensierung des Reagenzes die Pipette umkehren.
5. 1 bis 2 Tropfen Calcofluor White Reagenz zugeben. 1 bis 2 Min. warten.
6. Probe mit einem Deckglas abdecken.
7. Die Abstriche zunächst mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit 10X-Vergrößerung untersuchen und die Ergebnisse sodann bei stärkerer Vergrößerung bestätigen.
8. Gewebeschnitte mit Pilzzellen können in destilliertem Wasser abgespült werden und mit Perjodsäure-Schiff-Reagenz oder mittels der Methenamin-Silber-Methode nach Gomorri (GMS) erneut gefärbt werden.⁶

AUS ASPIRATEN ODER BRONCHOALVEOLÄRER LAVAGE (BAL) ERHALTENE PROBEN

1. Die benutzten Objektträger müssen sauber und fettfrei sein und dürfen keine Fremdkörper enthalten.
2. Proben können frisch sein oder nach Zentrifugation mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 7,4, auf die erwünschte Konzentration resuspendiert sein.
3. Mit einem Wachsmalstift auf dem Objektträger ein scharf umrissenes Quadrat abgrenzen.
4. Die Probe auf das Feld innerhalb des Wachsquadrates aufbringen; an der Luft trocknen lassen.
5. Die Fläche innerhalb des Quadrats mit 100 % Methanol bedecken; an der Luft trocknen lassen.
6. Ausreichend 10 % Kaliumhydroxidlösung zugeben, um die Proben gerade eben zu bedecken. Nicht durchtränken. 5 s. warten.
7. Calcofluor White Reagent dropper aufrecht halten und **DIE SPITZE VOM KÖRPER WEG RICHTEN**. Die Mitte mit Daumen und Zeigefinger ergreifen und vorsichtig zusammendrücken, um die Ampulle in der Tropfpipette aufzubrechen. **Vorsicht: Die Ampulle nur ein einziges Mal in der Nähe der Mitte brechen. Die Pipette nicht weiter handhaben, da das Plastik durchgestochen werden kann und Verletzungen möglich sind.** Mit dem Boden der Pipette einige Male leicht auf die Tischoberfläche klopfen. Für eine komfortable, tropfenweise Dispensierung des Reagenzes die Pipette umkehren.
8. 1 bis 2 Tropfen Calcofluor White Reagenz auf die Fläche innerhalb des Quadrates geben. 2 Min. warten.
9. Überschüssiges Calcofluor White-Reagenz vom Objektträger ablaufen lassen.
10. Die Proben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops betrachten:
 - a. Für die Ansicht als Wet Mount-Präparat nach Bedarf Calcofluor White Reagenz zugeben, mit einem Deckglas abdecken und mit dem entsprechenden Objektiv betrachten.
 - oder -
 - b. Für die Ansicht unter Ölimmersion nach Lufttrocknung direkt betrachten.

Qualitätskontrolle durch den Benutzer:

1. Die Färbelösung auf Anzeichen einer Zersetzung hin überprüfen (siehe "Produktverfall").
2. Die Qualität der Anfärbung mit frischen Kulturen von *Candida albicans* ATCC 10231 (positiv) und *Escherichia coli* ATCC 25922 (negativ) überprüfen.

Die Qualitätskontrollen müssen unter Einhaltung der örtlich, landesweit und/oder bundesweit geltenden Bestimmungen oder der Auflagen der Akkreditierungsorganisationen sowie der Standard-Qualitätskontrollverfahren Ihres Labors erfolgen. Anwendern wird geraten, die relevanten CSLI-Richtlinien und CLIA-Vorschriften über geeignete Maßnahmen zur Qualitätskontrolle einzusehen.

ERGEBNISSE

Unter Licht der empfohlenen Wellenlänge (300–412 nm) fluoreszieren Pilze grell apfelgrün oder blauweiß. Bakterien fluoreszieren nur schwach oder überhaupt nicht.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

In vielen klinischen Labors wird Fluoreszenzmikroskopie mittlerweile zur Untersuchung anderer Färbungen eingesetzt. Zum Erzielen der besten Ergebnisse mit dem Calcofluor White-Reagenz wird Quecksilberdampf anstelle einer Quartz-Halogenleuchte und eine UV/BV-Anregung empfohlen.¹ Mikroskope, die mit selektiven Filtern für die Anregung von Fluorescein (KP490 Interferenzfilter) ausgestattet sind, werden nicht empfohlen, da diese Filter verhindern, dass die geeignete Wellenlänge die Probe trifft.¹

Manche Fremdkörper können ebenfalls fluoreszieren und müssen morphologisch von Pilzelementen unterschieden werden.

Calcofluor White Reagent Droppers werden zur Identifizierung vermuteter Pilze verwendet. Alle positiven Abstriche müssen durch Kultivierung bestätigt werden.

Obwohl im Fall von *Cryptococcus* die Zellen selbst mit Calcofluor White gefärbt werden, wird die Kapsel Berichten zufolge nicht gefärbt; daher werden zur Bestätigung weitere Tests empfohlen.

Bakterien können fluoreszieren, jedoch zu einem geringeren Grad als Pilze und können mit durch Calcofluor White gefärbten Artefakten verwechselt werden. Die Anwesenheit von Pilzen muss morphologisch bestimmt werden.

Die Intensität der Fluoreszenzfärbung kann je nach zu färbendem Organismus variieren.

LEISTUNGSMERKMALE

BD führte eine Studie über das **BD BBL** Calcofluor White-Reagenz unter Verwendung der folgenden Organismen durch:

Aspergillus sp. (ATCC 36607)

Candida guilliermondii (ATCC 14242)

Microsporium canis (ATCC 10214)

Candida glabrata (ATCC 2001)

Candida albicans (ATCC 10231)

Cladosporium sp. (ATCC 13026)

Penicillium roquefortii (ATCC 9295)

Alle Objektträger wurden mittels der Wet-Mount-Methode dreifach präpariert, wie im Abschnitt "ALLGEMEINE PROBEN" des Testverfahrens beschrieben (einschließlich des Gebrauchs von 10 % Kaliumhydroxid-Reagenz). Ein Kontrollobjektträger war stark positiv (Zellulose via Baumwollfasern) und zwei waren negativ (*Escherichia coli* ATCC 25922 und ein nicht beimpfter Objektträger).

Die Objektträger wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, BH-2) ausgewertet, das mit einer 100 Watt Quecksilberlampe, einem Anregungsfilter (490 nm) und einem Barrierefilter (545 nm) ausgestattet war.

Die in dieser Studie ausgewerteten Organismen wiesen adäquate Fluoreszenzfärbungseigenschaften auf.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.- Nr. Beschreibung

261195 **BD BBL** Calcofluor White Reagent Droppers, 50.

261191 **BD BBL** 10 % Potassium Hydroxide Reagent Droppers, 50.

Literatur S. "References" im englischen Text.

BD Diagnostics Technischer Kundendienst: setzen Sie sich mit Ihrer zuständigen BD-Vertretung.

BD BBL Calcofluor White Reagent Droppers

Italiano

USO PREVISTO

I **BD BBL** Calcofluor White Reagent Droppers (dropper di reagente calcofluor white) sono usati in microscopia a fluorescenza per la rilevazione di funghi in strisci diretti.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

Calcofluor white è un colorante fluorocromatico non specifico che si lega ai funghi e, a seconda del sistema di filtro utilizzato, emette fluorescenza di colore verde mela o bianco-blu allorché esposto a una luce di lunghezza d'onda appropriata.¹ Può essere usato su campioni freschi, congelati, fissati, paraffinati e clinici.² È stato documentato che il calcofluor white può essere usato nella rilevazione del parassita *Pneumocystis jiroveci* (in precedenza *Pneumocystis carinii*)³ e di altri miceti opportunisti in campioni di lavaggio broncoalveolare (BAL) e aspirati di soggetti immunosoppressi.^{4,5}

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Calcofluor white è un sale disodico dell'acido 4,4'-bis-[4-anilino-bis-dietilamino-5-triazin-2-ilamino]-2,2'-stilbene-disolfonico, un colorante incolore utilizzato nell'industria tessile e cartaria come agente sbiancante. Ha la capacità di legarsi a β 1-3, β 1-4 polisaccaridi (ossia cellulosa e chitina) ed emette fluorescenza allorché esposto a luce ultravioletta a lunghezza d'onda lunga e luce visibile a lunghezza d'onda corta. È stato usato come marker biologico per colorare la parete cellulare di piante ed è pertanto estremamente utile nel delineare elementi fungini.⁶

REAGENTI

I Calcofluor White Reagent Droppers contengono 0,5 mL di soluzione allo 0,05 % di calcofluor white in acqua distillata.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*.

I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e il virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle norme dell'istituto e alle "Precauzioni standard".⁷⁻¹⁰ Prima dello smaltimento, sterilizzare in autoclave i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Modalità di conservazione - Conservare a temperatura ambiente (15 – 30 °C). Proteggere dalla luce.

Deterioramento del prodotto - Questo reagente è ermeticamente sigillato in una fiala che protegge la soluzione da instabilità chimiche fino alla data di scadenza. La soluzione colorante deve essere trasparente con una leggera tonalità verde. Non usare se è evidente un precipitato bianco macroscopico. Ogni dropper può essere usato per un giorno dopo la rottura della fiala. Non usare oltre la data di scadenza.

PROCEDURA

Materiale fornito - Calcofluor White Reagent Droppers. Ogni dropper contiene reagente sufficiente per colorare un vetrino.

Materiali necessari ma non forniti - Terreni di coltura accessori, 10% Potassium Hydroxide Reagent Dropper, n. di cat. 261191, microrganismi per controllo di qualità, microscopio a fluorescenza e altre apparecchiature di laboratorio necessarie per questa procedura.

Procedura del test

CAMPIONI GENERALI (capelli, unghie, pelle, altri tessuti, coltura, ecc.)

1. I vetrini usati devono essere puliti e privi di oli e detriti.
2. Preparare uno striscio del campione da colorare.
3. Dispensare 1 - 2 gocce di soluzione di idrossido di potassio al 10% e mescolare delicatamente per distribuire.

4. Tenere il Calcofluor White Reagent Dropper in posizione verticale **RIVOLGENDONE LA PUNTA IN DIREZIONE OPPOSTA A SÉ**. Stringere delicatamente la parte centrale con il pollice e l'indice per rompere la fiala all'interno del contagocce. **Attenzione: spezzare la fiala in prossimità del centro una volta sola. Non manipolare ulteriormente il contagocce in quanto la plastica potrebbe perforarsi e provocare lesioni.** Picchiettare alcune volte il fondo del contagocce sul piano di lavoro. Capovolgere quindi il contagocce per facilitare la dispensazione goccia a goccia del reagente.
5. Dispensare 1 - 2 gocce di reagente calcofluor white. Attendere 1 - 2 min.
6. Allestire il campione con un vetrino coprioggetti.
7. Con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza, esaminare gli strisci, inizialmente a 10X, quindi confermare i riscontri a un ingrandimento superiore.
8. Le sezioni di tessuto che presentano funghi possono essere risciacquate in acqua distillata e ricolorate con colorazione PAS (acido periodico-Schiff) o con la tecnica GMS (argento-metenamina secondo Gomori).⁶

CAMPIONI DI ASPIRATO O LAVAGGIO BRONCOALVEOLARE (BAL)

1. I vetrini usati devono essere puliti e privi di oli e detriti.
2. I campioni possono essere freschi o centrifugati e risospesi alla concentrazione appropriata in tampone fosfato isotonic (PBS), pH 7,4.
3. Contrassegnare un quadrato ben definito sul vetrino usando una matita a cera.
4. Dispensare il campione sull'area all'interno del quadrato in cera sul vetrino e lasciare asciugare all'aria.
5. Coprire l'area all'interno del quadrato con metanolo al 100% e lasciare asciugare all'aria.
6. Dispensare soluzione di idrossido di potassio al 10% in quantità appena sufficiente a coprire il campione. Non saturare. Attendere 5 s.
7. Tenere il Calcofluor White Reagent Dropper in posizione verticale **RIVOLGENDONE LA PUNTA IN DIREZIONE OPPOSTA A SÉ**. Stringere delicatamente la parte centrale con il pollice e l'indice per rompere la fiala all'interno del contagocce. **Attenzione: spezzare la fiala in prossimità del centro una volta sola. Non manipolare ulteriormente il contagocce in quanto la plastica potrebbe perforarsi e provocare lesioni.** Picchiettare alcune volte il fondo del contagocce sul piano di lavoro. Capovolgere quindi il contagocce per facilitare la dispensazione goccia a goccia del reagente.
8. Dispensare 1 - 2 gocce di reagente calcofluor white nell'area all'interno del quadrato. Attendere 2 min.
9. Rimuovere il reagente calcofluor white in eccesso.
10. Con l'ausilio di un microscopio a fluorescenza, esaminare il campione.
 - a. In caso di esame di un vetrino allestito in immersione, dispensare il reagente calcofluor white in base alle necessità, aggiungere un vetrino coprioggetti e analizzare con un obiettivo appropriato.
 - oppure -
 - b. In caso di esame in immersione di olio, analizzare direttamente dopo aver lasciato asciugare all'aria.

Controllo di qualità a cura dell'utente

1. Verificare che la soluzione di colorazione non presenti segni di deterioramento (vedere "Deterioramento del prodotto").
2. Controllare le prestazioni della colorazione con colture fresche di *Candida albicans* ATCC 10231 (positive) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (negative).

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità in uso nel laboratorio. Per una corretta esecuzione delle procedure relative al controllo di qualità, si consiglia di consultare le linee guida CLSI e le norme CLIA in materia.

RISULTATI

Allorché esposti a una luce della lunghezza d'onda suggerita (300 - 412 nm), i funghi emettono fluorescenza di colore verde mela o bianco-blu. I batteri emettono fluorescenza scarsa o non ne emettono affatto.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

Numerosi laboratori clinici usano ora la microscopia a fluorescenza per l'esame di altre colorazioni. Per ottenere i risultati migliori con il reagente calcofluor white, si raccomanda una lampada a vapore di mercurio anziché alogena al quarzo ed eccitazione UV/BV.¹ I microscopi provvisti di filtri selettivi per l'eccitazione della fluoresceina (filtro interferenza KP490) non sono raccomandati perché tali filtri impediscono alla lunghezza d'onda appropriata di investire il campione.¹

Alcuni detriti possono emettere fluorescenza e devono essere distinti dagli elementi fungini in base alla morfologia.

I Calcofluor White Reagent Droppers sono usati per l'identificazione presuntiva di funghi. Tutti gli strisci positivi devono essere confermati mediante coltura.

È stato documentato che con calcofluor white le cellule di *Cryptococcus* in sé si colorano, mentre invece la capsula non si colora; si raccomandano ulteriori test di conferma.

I batteri possono emettere fluorescenza, sebbene in misura inferiore ai funghi e possono essere confusi con artefatti colorati con calcofluor white. La presenza di funghi deve essere determinata in base alla morfologia.

L'intensità della colorazione fluorescente può variare a seconda del microrganismo colorato.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

BD ha condotto uno studio di **BD BBL** Calcofluor White Reagent usando i microrganismi seguenti:

<i>Aspergillus</i> sp. (ATCC 36607)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
<i>Candida guilliermondii</i> (ATCC 14242)	<i>Cladosporium</i> sp. (ATCC 13026)
<i>Microsporium canis</i> (ATCC 10214)	<i>Penicillium roquefortii</i> (ATCC 9295)
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)	

Tutti i vetrini sono stati allestiti in triplicato con il metodo di allestimento in immersione, descritto nella sezione "CAMPIONI GENERALI" della Procedura del test (incluso l'utilizzo del reagente idrossido di potassio al 10%). Sono stati inclusi un vetrino di controllo altamente positivo (cellulosa via fibre di cotone) e due vetrini di controllo negativo (*Escherichia coli* ATCC 25922 e un vetrino non inoculato).

I vetrini sono stati esaminati con un microscopio a fluorescenza (Olympus, BH-2) corredato di lampada al mercurio da 100 W, filtro eccitatore (490 nm) e filtro barriera (545 nm).

I microrganismi valutati in questo studio hanno evidenziato caratteristiche di colorazione fluorescente appropriate.

DISPONIBILITÀ

N. di cat. Descrizione

261195 **BD BBL** Calcofluor White Reagent Droppers, 50.

261191 **BD BBL** 10% Potassium Hydroxide Reagent Droppers, 50.

BIBLIOGRAFIA Vedere "References" nel testo inglese.

Assistenza e supporto tecnico BD Diagnostics: rivolgersi al rappresentante locale BD.

BD BBL Calcofluor White Reagent Droppers

Español

USO PREVISTO

Los **BD BBL** Calcofluor White Reagent Droppers (cuentagotas con reactivo blanco de calcoflúor **BD BBL**) se utilizan para la detección rápida de hongos con microscopio de fluorescencia en frotis directos.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El blanco de calcoflúor es un colorante de fluorocromo inespecífico que se fija a los hongos y, en función del sistema de filtración utilizado, emite fluorescencia de color verde manzana o blanco azulado cuando se expone a una luz de longitud de onda oportuna¹. Se puede utilizar en muestras frescas, congeladas, fijadas, incluidas en parafina y clínicas². Se ha indicado que el blanco de calcoflúor puede utilizarse para la detección de *Pneumocystis jiroveci* (antes *Pneumocystis carinii*)³ parásitos y otros organismos fúngicos oportunistas en muestras y aspirados de lavado broncoalveolar (LBA) de individuos inmunosuprimidos^{4,5}.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El blanco de calcoflúor es una sal disódica del ácido 4,4'-bis-[4-anilino-bis-dietilamino-5-triazín-2-ilamino]-2,2'-estilbeno-disulfónico, un colorante incoloro utilizado en la industria textil y papelera como agente blanqueador. Tiene la facultad de fijarse a los polisacáridos β 1-3, β 1-4 (esto es, celulosa y quitina) y presenta fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta de longitud de onda larga y a la luz visible de longitud de onda corta. Se ha utilizado como marcador biológico para teñir las paredes celulares de las plantas y por tanto tiene valor para delinear los elementos fúngicos⁶.

REACTIVOS

Los Calcofluor White Reagent Droppers contienen 0,5 mL de una solución al 0,05 % de blanco de calcoflúor en agua destilada.

Advertencias y precauciones:

Para uso diagnóstico *in vitro*.

En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales, deben seguirse las "Precauciones estándar"⁷⁻¹⁰ y las directrices del centro. Esterilizar en autoclave los recipientes para muestras y cualquier otro material contaminado antes de desecharlos.

Instrucciones de conservación: Conservar a temperatura ambiente 15-30 °C. Proteger de la luz.

Deterioro del producto: Este reactivo está sellado herméticamente en una ampolla, la cual protege la solución contra la inestabilidad química hasta la fecha de caducidad. La solución de tinción debe ser transparente con un ligero tono verde. No utilizar si se observa un precipitado blanco denso. Cada cuentagotas tiene un período de validez de un día después de romper la ampolla. No utilizar después de la fecha de caducidad.

PROCEDIMIENTO

Material suministrado: Calcofluor White Reagent Droppers. Cada cuentagotas contiene suficiente reactivo para teñir un portaobjetos.

Materiales necesarios pero no suministrados: Medios de cultivo auxiliares, reactivos, 10 % Potassium Hydroxide Reagent Dropper (cuentagotas con reactivo de hidróxido potásico al 10 %), N° de cat. 261191, organismos de control de calidad, un microscopio de fluorescencia y demás equipo de laboratorio necesario para este procedimiento.

Procedimiento del análisis:

MUESTRAS GENERALES (pelo, uñas, piel, otros tejidos, cultivo, etc.)

1. Los portaobjetos utilizados deben estar limpios y libres de aceites y residuos.
2. Preparar un frotis de la muestra a teñir.
3. Añadir 1 a 2 gotas de solución de hidróxido potásico al 10 % y mezclar suavemente para extenderla.
4. Sostener el Calcofluor White Reagent dropper en posición vertical **CON LA PUNTA DIRIGIDA HACIA FUERA**. Sujetar el envase por su parte central entre los dedos pulgar e índice y apretarlo con cuidado para romper la ampolla dentro del cuentagotas. **Precaución: Romper la ampolla una sola vez cerca de su parte central. No manipular más el cuentagotas porque puede perforarse el plástico y causar lesiones.** Golpear suavemente la parte inferior del cuentagotas sobre la mesa unas cuantas veces. Invertir para que el reactivo pueda ser dispensado cómodamente gota a gota.
5. Agregar 1 a 2 gotas del reactivo blanco de calcoflúor. Esperar 1 a 2 min.
6. Montar la muestra con un cubreobjetos.
7. Utilizando un microscopio de fluorescencia, examinar los frotis inicialmente a 10X y confirmar después los hallazgos con mayor ampliación.
8. Las secciones de tejido que presentan hongos pueden lavarse con agua destilada y volverse a teñir con colorante de ácido peryódico de Schiff o mediante la técnica de metenamina y plata de Gomori (GMS)⁶.

MUESTRAS DE ASPIRADO O LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

1. Los portaobjetos utilizados deben estar limpios y libres de aceites y residuos.
2. Las muestras pueden ser frescas o estar centrifugadas y resuspendidas a la concentración oportuna en suero salino tamponado con fosfato (PBS), pH 7,4.
3. Señalar un cuadrado bien definido en el portaobjetos con un marcador de cera.
4. Aplicar la muestra a la zona dentro del cuadrado de cera en el portaobjetos; dejar secar al aire.
5. Cubrir la zona dentro del cuadrado con metanol al 100 %; dejar secar al aire.
6. Agregar cantidad suficiente de solución de hidróxido potásico al 10 % para cubrir la muestra. No saturar. Esperar 5 s.

7. Sostener el Calcofluor White Reagent dropper en posición vertical **CON LA PUNTA DIRIGIDA HACIA FUERA**. Sujetar el envase por su parte central entre los dedos pulgar e índice y apretarlo con cuidado para romper la ampolla dentro del cuentagotas. **Precaución: Romper la ampolla una sola vez cerca de su parte central. No manipular más el cuentagotas porque puede perforarse el plástico y causar lesiones.** Golpear suavemente la parte inferior del cuentagotas sobre la mesa unas cuantas veces. Invertir para que el reactivo pueda ser dispensado cómodamente gota a gota.
8. Agregar 1 a 2 gotas del reactivo blanco de calcoflúor a la zona dentro del cuadrado. Esperar 2 min.
9. Escurrir el exceso de reactivo blanco de calcoflúor del portaobjetos.
10. Examinar la muestra con un microscopio de fluorescencia:
 - a. Para examinarla como muestra de preparación húmeda, añadir reactivo blanco de calcoflúor en la medida necesaria y un cubreobjetos, y examinar con el objetivo adecuado.
 - o -
 - b. Para examinarla bajo inmersión en aceite, después del secado al aire, examinarla directamente.

Control de calidad del usuario:

1. Observar si la solución colorante presenta signos de deterioro (véase “Deterioro del producto”).
2. Comprobar el rendimiento de la tinción con cultivos recientes de *Candida albicans* ATCC 10231 (positivos) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (negativos).

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones pertinentes del CSLI y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

RESULTADOS

Cuando se exponen a una luz de la longitud de onda recomendada (300–412 nm), los hongos emiten fluorescencia de color verde manzana vivo o blanco azulado. Las bacterias emiten una fluorescencia débil o nula.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Muchos laboratorios clínicos utilizan actualmente microscopía fluorescente para examinar otras cepas. Para obtener resultados óptimos con el reactivo blanco de calcoflúor se recomienda el uso de una lámpara de vapor de mercurio en lugar de una lámpara halógena de cuarzo, y excitación UV/BV¹. No se recomiendan los microscopios dotados de filtros selectivos para la excitación de la fluoresceína (filtro de interferencia KP490) ya que estos filtros impiden que llegue a la muestra la longitud de onda adecuada¹.

Ciertos residuos pueden emitir fluorescencia y deben diferenciarse de los elementos fúngicos con base en la morfología.

Los Calcofluor White Reagent Droppers se utilizan para la identificación provisional de los hongos. Todos los frotis positivos deben confirmarse mediante cultivo.

Aunque las propias células de *Cryptococcus* se tiñen con el blanco de calcoflúor, se ha registrado de la cápsula no lo hace; se recomienda efectuar más pruebas para confirmarlo.

Las bacterias pueden emitir fluorescencia en menor grado que los hongos y pueden confundirse con artefactos teñidos con blanco de calcoflúor. La presencia de hongos debe determinarse con base en la morfología.

La intensidad de la tinción fluorescente puede variar en función del organismo teñido.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

BD llevó a cabo un estudio del reactivo blanco de calcoflúor **BD BBL** utilizando los siguientes organismos:

<i>Aspergillus</i> sp. (ATCC 36607)	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)
<i>Candida guilliermondii</i> (ATCC 14242)	<i>Cladosporium</i> sp. (ATCC 13026)
<i>Microsporium canis</i> (ATCC 10214)	<i>Penicillium roquefortii</i> (ATCC 9295)
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2001)	

Todas las muestras se prepararon por triplicado con el método de preparación húmeda del modo descrito en la sección de “MUESTRAS GENERALES” del Procedimiento de análisis (incluyendo el uso del reactivo de hidróxido potásico al 10%). Hubo una muestra de control altamente positiva (celulosa en fibras de algodón) y dos muestras de control negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y una muestra no inoculada).

Las muestras fueron examinadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus, BH-2) dotado de una lámpara de mercurio de 100 w, filtro excitador (490 nm) y filtro de barrera (545 nm).

Los organismos evaluados en dicho estudio presentaron características adecuadas de tinción fluorescente.

DISPONIBILIDAD

Nº de cat. Descripción

261195 **BD BBL** Calcofluor White Reagent Droppers, 50.

261191 **BD BBL** 10% Potassium Hydroxide Reagent Droppers, 50.

REFERENCIAS Ver “References” en el texto en inglés.

Servicio técnico de BD Diagnostics: póngase en contacto con el representante local de BD.



Manufacturer / Производител / Výrobce / Fabrikant / Hersteller / Κατασκευαστής / Fabricante / Tootja / Fabricant / Producent / Gyártó / Fabbrikante / Atkärare / Gamintojas / Ražotājs / Tilvirker / Producent / Producător / Производитель / Výrobca / Proizvođač / Tillverkare / Üretici / Виробник



Use by / Използвайте до / Spotføjte do / Brug før / Verwendbar bis / Χρήση έως / Usar antes de / Kasutada enne / Date de péremption / Upotrijebiti do / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Дейін пайдалануға / Naudokite iki / Izlietot līdz / Houdbaar tot / Brukes for / Stosować do / Prazo de validade / A se utiliza până la / Использовать до / Použite do / Upotrebiti do / Använd före / Son kulanma tarihi / Використати до line
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutning af måned)
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende)
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fin del mes)
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp)
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja)
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese)
 ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА / (АА = айдың соңы)
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga)
 GGGG-MM-DD/GGGG-MM (MM = mēneša beigas)
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutten av måneden)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês)
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii)
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца)
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca)
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca)
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = slutet av månaden)
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu)
 PPPP-MM-DD / PPPP-MM (MM = кінець місяця)



Catalog number / Каталоген номер / Katalogové číslo / Katalognummer / Αριθμός καταλόγου / Número de catálogo / Kataloginummer / Numéro catalogue / Kataloški broj / Katalógusszám / Numero di catalogo / Каталог номер / Katalogo numeris / Kataloga numurs / Catalogus nummer / Numer katalogowy / Număr de catalog / Номер по каталору / Katalógové číslo / Kataloški broj / Katalog numarası / Номер за каталогом



Authorized Representative in the European Community / Оторизиран представител в Европейската общност / Autorizovaný zástupce pro Evropském společenství / Autoriseret repræsentant i De Europæiske Fællesskaber / Autorisierter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Reprezentante autorizado en la Comunidad Europea / Volitatud esindaja Euroopa Nõukogus / Représentant autorisé pour la Communauté européenne / Autorizuirani predstavnik u Europskoj uniji / Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségekben / Reprezentante autorizzato nella Comunità Europea / Европа қауымдастығындағы уәкілетті екіл / Įgaliotasis atstovas Europos Bendrijoje / Pilnvarotais pārstāvis Eiropas Kopienā / Bevoegde vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap / Autorisert representant i EU / Autoryzowane przedstawicielstwo we Wspólnocie Europejskiej / Reprezentante autorizado na Comunidade Europeia / Reprezentantul autorizat pentru Comunitatea Europeană / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Autorizovano predstavništvo u Evropskoj uniji / Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen / Avrupa Topluluğu Yetkili Temsilcisi / Уповноважений представник у країнах ЄС



In Vitro Diagnostic Medical Device / Медицински уред за диагностика ин витро / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In vitro diagnostika meditsiiniaparatuur / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medicale per diagnostica in vitro / Жасанды жағдайда жұмыс ітетін медициналық диагностика аспабы / In vitro diagnostikos prietaisai / Medicīnas ierīces, ko lieto in vitro diagnostikā / Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Dispositiv medical pentru diagnostic in vitro / Медицинский прибор для диагностики in vitro / Medicínska pomôcka na diagnostiku in vitro / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik / In Vitro Diyagnostik Tibbi Cihaz / Медицинский прибор для диагностики in vitro



Temperature limitation / Температурни ограничения / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturbegrenzung / Περιορισμοί θερμοκρασίας / Limitación de temperatura / Temperatuuri piirang / Limites de température / Dozvoljena temperatura / Hőmérsékleti határ / Limiti di temperatura / Температураны шектеу / Laikymo temperatūra / Temperatūras ierobežojumi / Temperaturlimit / Temperaturbegrensning / Ograniczenie temperatury / Limites de temperatura / Limite de temperatură / Ограничение температуры / Ohraničenie teploty / Ograničenje temperature / Temperaturgräns / Sıcaklık sınırlaması / Обмеження температури



Batch Code (Lot) / Код на партидата / Kód (číslo) šarže / Batch-kode (lot) / Batch-Code (Charge) / Κωδικός παρτίδας (παρτίδα) / Código de lote (lote) / Partii kood / Numéro de lot / Lot (kod) / Tétel száma (Lot) / Codice batch (lotto) / Топтама коды / Partijos numeris (LOT) / Partijas kods (laidijs) / Lot number / Batch-kode (parti) / Код партии (serija) / Código do lote / Cod de serie (Lot) / Код партии (лот) / Kód série (šarža) / Kod serije / Partinummer (Lot) / Parti Kodu (Lot) / Код партії



Contains sufficient for <n> tests / Съдържанието е достатъчно за <n> теста / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα για <n> εξετάσεις / Contenido suficiente para <n> pruebas / Küllaldane <n> testide jaoks / Contenu suffisant pour <n> tests / Sadržaj za <n> testova / <n> teszthez elegendő / Contenido suficiente per <n> test / <n> тесттері үшін жеткілікті / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Satur pietiekami <n> pārbaudēm / Inhoud voldoende voor "n" testen / Innholder tilstrekkelig til <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Conținuto suficiente para <n> teste / Conținut suficient pentru <n> teste / Достаточо для <n> тестов(a) / Obsah vystačí na <n> testov / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Innehåller tillräckligt för <n> analyser / <n> test için yeterli miktarda içerir / Вистачить для аналізу: <n>



Consult Instructions for Use / Направете справка в инструкциите за употреба / Prostudujte pokyny k použití / Se brugsanvisningen / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Consultar las instrucciones de uso / Lugeda kasutusjuhendit / Consulter la notice d'emploi / Koristi upute za upotrebu / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Skatīt lietošanas pamācību / Raadpleeg de gebruiksaanwijzing / Se i brugsanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consultar as instruções de utilização / Consultați instrucțiunile de utilizare / См. руководство по эксплуатации / Pozri Pokyny na používanie / Pogledajte uputstvo za upotrebu / Se brugsanvisningen / Kullanım Talimatları'na başvurun / Див. інструкції за використання



Keep away from light / Пазете от светлина / Nevystavujte světlu / Må ikke udsættes for lys
/ Vor Licht schützen / Κρατήστε το μακριά από το φως / Mantener alejado de la luz / Hoida
eemal valgusest / Conserver à l'abri de la lumière / Držati dalje od svjetla / Fény nem érheti /
Tenere al riparo dalla luce / Қараңғыланған жерде ұста / Laikyti atokiau nuo šilumos šaltinių
/ Sargāt no gaismas / Niet blootstellen aan zonlicht / Må ikke utsettes for lys / Przechowywać
z dala od źródła światła / Manter ao abrigo da luz / Feriți de lumină / Хранить в темноте /
Uchovávať mimo dosahu svetla / Držite dalje od svetlosti / Får ej utsättas för ljus / Işıktan
uzak tutun / Берегти від дії світла



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA



Benex Limited
Pottery Road, Dun Laoghaire
Co. Dublin, Ireland

Australian Sponsor:

Becton Dickinson Pty Ltd.
4 Research Park Drive
Macquarie University Research Park
North Ryde, NSW 2113
Australia

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.

BD, BD Logo and BBL are trademarks of Becton, Dickinson and Company. © 2016 BD.