



SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!
See the following pages for more information!



Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

mail@szabo-scandic.com

www.szabo-scandic.com

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

PREMIER™

CRYPTOCOCCAL ANTIGEN

REF Catalogue Number 602096

IVD In Vitro Diagnostic Medical Device

EIA for the Detection of Cryptococcal Antigen in Serum and CSF

INTENDED USE

The Premier Cryptococcal Antigen enzyme immunoassay (EIA) is a screening or a semi-quantitative test system for the detection of capsular polysaccharide antigens of *Cryptococcus neoformans* in serum and cerebrospinal fluid (CSF).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Cryptococcosis is typically initiated as a subclinical pulmonary infection caused by the encapsulated soil yeast *C. neoformans*.¹ Although *C. neoformans* can infect any organ, the most serious complications occur when the organism invades the central nervous system of the immunocompromised patient.¹⁻³ Four major serotypes (A-D) exist within the capsular polysaccharide antigen, with 80-85% of isolates being either A or B.⁴

Detection of cryptococcal antigens in serum or CSF is used successfully in the diagnosis of meningitis associated with infection by *C. neoformans*.^{1-3,7,8} When both serum and CSF are evaluated the sensitivity of antigen detection is greater than 90%.^{1,2,8} Antigen detection is more sensitive than the India ink mount^{5,8} and is a valuable aid in establishing a diagnosis when the culture is negative.⁶

Determining the relative changes in antigen levels has prognostic value and is used to monitor the efficacy of drug therapy.^{1,2,5,6}

The Premier Cryptococcal Antigen EIA detects and provides a reliable semi-quantitative determination of all cryptococcal antigen serotypes present in specimens.

PRINCIPLE OF THE TEST

The Premier Cryptococcal Antigen EIA utilizes anticryptococcal polyclonal antibodies adsorbed to microwells and a detection system based upon a monoclonal-peroxidase conjugate. If cryptococcal antigens are present in the sample, a complex is formed between the antigens, enzyme conjugate, and the adsorbed antibody. After washing to remove unbound conjugate, a substrate solution is added. Color develops in the presence of bound enzyme. The amount of color is related to the quantity of cryptococcal antigen present.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

- 1. Premier Enzyme Conjugate** – Cryptococcal antigen specific monoclonal antibody conjugated to horseradish peroxidase in buffered protein solution containing 0.02% Thimerosal as a preservative.
- 2. Premier 20X Wash Buffer II** – Concentrated wash buffer containing 0.2% Thimerosal as a preservative.
- 3. Premier Substrate II** – Buffered solution containing urea peroxide and tetramethylbenzidine.
- 4. Premier Stop Solution II** – 2N Sulfuric acid. **CAUTION:** Avoid contact with skin. Flush with water if contact occurs.
- 5. Premier Positive Control** – Cryptococcal antigen in buffered protein solution containing 0.01% Thimerosal and 0.16% Gentamicin as preservatives.
- 6. Premier Sample Diluent** – Buffered protein solution containing 0.02% Thimerosal as a preservative.
- 7. Premier Antibody Coated Microwells** – Breakaway plastic microwell strips coated with polyclonal antibodies specific for cryptococcal antigen.
- 8. Microwell Strip Holder**

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

MATERIALS NOT PROVIDED

1. Pipettes capable of delivering 50 µL, 100 µL and 200 µL.
2. Test tubes (12 x 75 mm) for dilution of sample.
3. Distilled or deionized water.
4. EIA plate reader capable of reading absorbance at 450 nm or 450/630.
5. Squirr bottle or automatic EIA plate washer.
6. Timer.
7. Graduated cylinder for making 1X Wash Buffer.

PRECAUTIONS

1. All reagents are for *in vitro* diagnostic use only.
2. Patient specimens may contain infectious agents and should be handled and disposed of as potential biohazards. Wear disposable gloves while handling patient specimens and performing the test procedure.
3. All reagents should be gently mixed and at room temperature before use.
4. Do not interchange reagents from different kit lot numbers or use expired reagents.
5. Hold reagent vials vertically to ensure proper drop size and delivery.
6. Return caps to correct vials.
7. The Positive Control contains inactivated cryptococcal antigen. This reagent, used wash buffer, used microwells, etc., should be disposed of as potentially hazardous material. The microwell plate holder should be disinfected and retained for future assays.
8. Avoid skin contact with Stop Solution (2N Sulfuric Acid). Flush with water immediately if contact occurs.

9. **Unused microwells must be placed back inside the foil ziplock pouch and sealed immediately. It is important to protect strips from moisture.**
10. Avoid splashing when dispensing diluted sample into microwells by placing the pipette tip about halfway down the microwell and dispensing slowly down the side of the microwell.
11. Perform microwell washing as directed in the assay procedure. **Inadequate washing may cause elevated background.**
12. Incubation times and reagent concentrations have been optimized for sensitivity and specificity. Avoid any deviations from set incubation times or dilutions.
13. Do not store specimens in a frost-free type freezer. Freezing and thawing of a specimen repeatedly can affect test results.

RISK AND SAFETY PHRASES

Sulfuric Acid

Stop Solution II - Xi Irritant

R PHRASES

R:36/38 Irritating to eyes and skin

Methanol

Substrate II - F – Highly Flammable, T – Toxic

R PHRASES

R:11 Highly flammable.
R:66 Repeated exposure may cause skin dryness or cracking.
R:20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R:39/23/24/25 Toxic: danger of very serious irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed.

S PHRASES

S:45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).
S:36 Wear suitable protective clothing.
S:37 Wear suitable gloves.

Thimerosal

20X Wash Buffer II - Xn Harmful

R PHRASES

R:33 Danger of cumulative effects.
R:20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

S PHRASES

S:36 Wear suitable protective clothing.
S:37 Wear suitable gloves.

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use.

REAGENT PREPARATION

1. Bring the entire kit including microwell pouch to room temperature before use.
2. Prepare enough 1X Wash Buffer for use by diluting 1 part 20X Wash Buffer with 19 parts purified water. The 1X Wash Buffer can be stored at room temperature for up to one month.

SPECIMEN PREPARATION

1. **Cerebrospinal Fluid**
 - a. Collect specimen aseptically following accepted procedures. (**See PRECAUTION #2**).
 - b. Centrifuge at 1000 xg for 15 minutes to ensure the removal of all white cells and particulate matter.
 - c. Carefully aspirate the CSF into a sterile container and seal.
 - d. Specimen may be tested immediately, stored up to 3 days at 2-8 C, or preserved by freezing. Do not store in a frost-free freezer.
2. **Serum**
 - a. Collect whole blood aseptically according to in-house procedures. (**See PRECAUTION #2**). The specimen must not contain anticoagulants as this may invalidate the test.
 - b. Permit blood to clot for 10 minutes or more at room temperature in a collection tube.
 - c. Centrifuge at 1000 xg for 10 minutes.
 - d. Carefully aspirate the serum into a sterile container and seal.
 - e. Specimen may be tested immediately, stored up to 3 days at 2-8 C, or preserved by freezing. Do not store in a frost-free freezer.

NOTE: Pretreatment of specimens is not recommended for the Premier Cryptococcal Antigen EIA. Studies indicate that pronase or heat treatment of specimens (56 C, 15 minutes) does not appear to adversely effect screening assay results. Occasionally, pronase or heat treatment alters EIA Titers. Therefore, if pronase treatment is used, it is essential that pronase be used for **all** serial specimens from an individual patient which are utilized to monitor therapy.

Specimens to be used for future comparisons should be aliquotted and frozen, as storage longer than 72 hours at 2-8 C may affect titers.

SCREENING ASSAY PROCEDURE

This test should be performed by qualified personnel per local regulatory requirements.

The screening assay procedure can be performed directly with serum or CSF prepared as above. The screening assay is intended solely for differentiation of positive and negative specimens. Values obtained with the screening assay cannot be used for calculation of EIA Titers. For accurate determination, the semi-quantitative assay should be performed.

- Snap off a sufficient number of microwells for samples and two controls. Insert microwells into the holder and record sample positions. **(See PRECAUTION #9).**
- Add 50 µL of each specimen, Sample Diluent (negative control), and 1 drop of Positive Control to the bottom of separate microwells. Mix by gently shaking. **Caution should be taken not to cross contaminate samples, as this could cause erroneous results.**
- Incubate at room temperature (20-30 C) for 10 minutes.
- Remove samples from each microwell by aspiration or by inverting the microwells and firmly tapping on an absorbent pad. Fill each microwell with 1X Wash Buffer (approximately 300 µL). Invert the microwells and firmly tap on an absorbent pad. Repeat this wash procedure three times for a total of four washes. **(See PRECAUTION #11).**
- Add 1 drop of Enzyme Conjugate to each microwell. Mix by gently shaking. Incubate at room temperature (20-30 C) for 10 minutes.
- Remove solution from each microwell by aspiration or by inverting the microwells and firmly tapping on an absorbent pad. Fill each microwell with 1X Wash Buffer (approximately 300 µL). Invert the microwells and firmly tap on an absorbent pad. Repeat this wash procedure three times for a total of four washes. **(See PRECAUTION #11).**
- Add 2 drops of Substrate Solution to each microwell. Mix by gently shaking 15-20 seconds.
- Incubate at room temperature (20-30 C) for 10 minutes.
- Add 2 drops of Stop Solution to each microwell. Mix by gently shaking and wait 2 minutes before reading.
- Observe Reactions:
 - Visual determination – Read within 15 minutes after adding Stop Solution.
 - Spectrophotometric Determination – Zero EIA reader on air. Wipe the underside of microwells with a lint free tissue. Read absorbance at 450 nm or 450/630 nm within 15 minutes after adding Stop Solution.
- Disinfect and retain microwell holder. Discard the used assay materials as biohazardous waste.

QUALITY CONTROL

At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing, or leakage.

The positive and negative controls must be used with each batch of specimens to provide quality assurance of the reagents.

The negative control (Sample Diluent) absorbance should be > 0.000 and < 0.100 at 450 nm or > 0.000 and < 0.070 at 450/630 nm. The Positive Control absorbance should be > 0.700 at either 450 nm or 450/630 nm.

If absorbance values do not correspond to visual readings, wipe the underside of the microwell, check the alignment of the microwells within the plate holder as well as the alignment of the plate holder, and reread.

It is suggested that the results of each quality control check be recorded in an appropriate log book to facilitate monitoring testing procedures and to comply with regulatory agencies.

If the expected values are not observed, please contact Meridian Technical Services Department at 1-800-343-3858.

INTERPRETATION OF SCREENING ASSAY

- Visual Reading
 - Negative = Colorless
 - Positive = Definite yellow color
 - Use an EIA reader if there is uncertainty in determining a definite yellow color.
- Spectrophotometric Single Wavelength (450 nm)
 - Negative = $OD_{450} < 0.100$
 - Indeterminant = $OD_{450} \geq 0.100$ and < 0.150
 - Positive = $OD_{450} \geq 0.150$
- Spectrophotometric Dual Wavelength (450/630 nm)
 - Negative = $OD_{450/630} < 0.070$
 - Indeterminant = $OD_{450/630} \geq 0.070$ and < 0.100
 - Positive = $OD_{450/630} \geq 0.100$

Indeterminant results should be repeated. If the repeated results are still indeterminate, a second specimen should be obtained and tested. Extremely strong reactions may yield a purple precipitate within a few minutes of stopping; these reactions should be reported as positive.

SEMI-QUANTITATIVE ASSAY PROCEDURE

This test should be performed by qualified personnel per local regulatory requirements.

The semi-quantitative assay procedure can be performed on any positive CSF or serum specimen. This procedure is intended to yield values necessary for calculation of an accurate EIA Titer.

If drug therapy is to be monitored using sequential specimens, the preferred method is to repeat each specimen at the same time as the new specimen is titered. It is not recommended that EIA titers from different assay runs be compared directly to monitor therapy. To prevent multiple freeze-thawing of specimens, several aliquots of each specimen should be frozen.

A. Dilutions

The following dilution series is recommended when performing the semi-quantitative procedure. Combine 100 µL of specimen and 100 µL of Sample Diluent in a test tube, labeled #1, and vortex 1-3 seconds. From this mixture prepare a series of five-fold dilutions as follows:

- Place 200 µL of Sample Diluent in each of 4 test tubes labeled 2-5.

- Using a clean pipet, transfer 50 µL of the diluted patient specimen from tube #1 into tube #2 and mix well.
- Transfer 50 µL from tube #2 into tube #3 and mix well. Continue this dilution procedure through tube #5. Further 1:5 dilutions may be made, if necessary. Final dilutions are: 1:2, 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250

B. Assay Procedure

For increased precision, all reagents must be delivered using a pipetter. Use the dropper bottle to deliver the required number of drops (see below) into a clean test tube. Transfer the required volumes of reagents to the microwells using a pipetter.

NOTE: Do not remove dropper tips from reagent bottles; contamination may compromise activity.

Number of Drops Required

	Enzyme Conjugate	Substrate	Stop Solution
1 Titer (7 wells)	7	22	12
2 Titers (12 wells)	11	35	19
3 Titers (17 wells)	15	49	27
4 Titers (22 wells)	19	62	30
10 titers (52 wells)	42	143	79

- Snap off a sufficient number of microwells for diluted samples and two controls. Insert into the microwell holder and record sample positions. **(See PRECAUTION #9).**
- Pipet 50 µL of each diluted sample, Positive Control and Sample Diluent (negative control) into the bottom of separate microwells. **Caution should be taken not to cross contaminate samples, as this could cause erroneous results.**
- Incubate at room temperature (20-30 C) for 10 minutes.
- Remove solution from each microwell by aspiration or by inverting microwells and firmly tapping on an absorbent pad. Fill each microwell with 1X Wash Buffer (approximately 300 µL). Invert microwells and firmly tap on an absorbent pad. Repeat this wash procedure three times for a total of four washes. **(See PRECAUTION #11).**
- Pipet 50 µL of Enzyme Conjugate into each microwell, including control microwells. Mix by gently shaking. Incubate at room temperature (20-30 C) for 10 minutes.
- Remove solution from each microwell by aspiration or by inverting the microwells and firmly tapping on an absorbent pad. Fill each microwell with 1X Wash Buffer (approximately 300 µL). Invert the microwells and firmly tap on an absorbent pad. Repeat this wash procedure three times for a total of four washes. **(See PRECAUTION #11).**
- Pipet 100 µL of Substrate Solution into each microwell. Mix by gently shaking 15-30 seconds.
- Incubate at room temperature (20-30 C) for 10 minutes.
- Pipet 100 µL of Stop Solution into each microwell. Mix by gently shaking and wait 2 minutes before reading.
- Spectrophotometric Determination – Zero EIA reader on air. Wipe the underside of wells with a lint free tissue. Read absorbance at 450 nm or 450/630 nm within 15 minutes after adding Stop Solution.
- Disinfect and retain microwell holder. Discard the used assay materials as biohazardous waste.

INTERPRETATION OF SEMI-QUANTITATIVE ASSAY

NOTE: Quality Control procedures listed after the Screening Assay should be followed when performing the semi-quantitative assay.

When using a single wavelength reader to obtain results for the semi-quantitative assay, the absorbance of the negative control (Sample Diluent) must be subtracted from all other absorbance values before calculation of the EIA Titer.

Dual wavelength absorbance values need not be adjusted.

A. Selections of Absorbance Values for Calculations

- Use only absorbance values which are from the semi-quantitative assay to calculate the EIA titer.
- Select the highest absorbance value within the acceptable range of 0.100 and 1.500 to calculate the EIA titer. If the next greater dilution also yields an absorbance within the acceptable range, this value should also be selected.
- If the 1:2 dilution of the specimen yields an absorbance < 0.100, repeat the assay on the undiluted specimen.
- Using the selected absorbance, calculate the EIA titer as outlined in B below. If two absorbances are selected, calculate each titer separately and average the results.

NOTE: Appearance of a purple precipitate does not invalidate a positive result, but readings from such wells cannot be used for calculation of EIA Titer.

B. Calculation

- Calculate the EIA titer for a particular specimen with the following formula:

$$\text{Absorbance Value} \times \text{Multiplication Factor} = \text{EIA titer}$$

Tube/Well Number	Multiplication Factors*				
	1	2	3	4	5
Dilution	1:2	1:10	1:50	1:250	1:1250
Multiplication Factor	20	100	500	2,500	12,500

*Use a Multiplication Factor of 10 to calculate an EIA titer for undiluted specimens.

2. Sample Calculations:
For example, if a patient specimen had an absorbance of 1.2 at a 1:50 dilution, the EIA Titer would be: $1.2 \times 500 = 600$ which is reported as 1:600

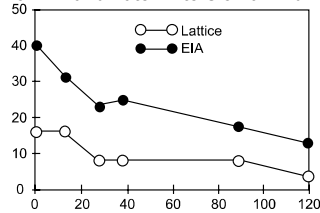
C. Reporting EIA Titers

Numbers derived from the EIA calculations may be reported to physicians as the EIA Titer. A higher titer reflects a greater concentration of antigen. However, do not attempt to compare EIA Titer with latex titer. Due to serotype variations and differing test technologies, EIA Titers are not numerically equivalent to latex titers. Decreases in titers of less than four-fold are not considered clinically significant.⁶

EXPECTED VALUES

Cryptococcal antigen in CSF or serum of the untreated patient indicates an active infection.¹⁻³ The Premier Cryptococcal Antigen EIA should have both diagnostic and prognostic value since antigen concentrations rise during disease progression and fall during successful treatment.^{1,2,5,6} Failure of titers to decline may indicate inadequate therapy. However, in some treated patients, antigen levels may remain stationary for extended periods of time when no viable organisms can be demonstrated.⁸

Comparison of EIA and Latex Titers on an Individual Patient



The primary use for semi-quantitative values derived with the latex or the EIA is to follow the course of disease and treatment within an individual patient. These data suggest that the Premier Cryptococcal Antigen EIA will be a valuable method for monitoring the efficacy of drug therapies.

AIDS patients may have very high EIA Titers. The dilution series recommended in the procedure may not be adequate to calculate an EIA Titer. Further 1:5 dilutions may be made as needed.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The Premier Cryptococcal Antigen EIA is intended for use with CSF or serum specimens. Use of this assay is not recommended with other specimens.

A negative result does not preclude diagnosis of cryptococcosis, particularly if only a single specimen has been tested and the patient shows symptoms consistent with cryptococcosis.

A positive result implies the presence of cryptococcal antigen; however, all test results should be reviewed in light of other clinical data by the physician. *Trichosporon beigeli* yielded a false positive in a single case with latex⁹ and a similar cross-reaction is possible with the EIA.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Premier Cryptococcal Antigen EIA was evaluated at two major clinical laboratories (279 specimens) in the United States and at Meridian Bioscience, Inc., (88 specimens, including one indeterminate specimen. Insufficient quantity precluded retesting of the indeterminate, and this specimen is not listed below). The CALAS® Latex Agglutination System was used as the reference assay. The combined test results are summarized in the table below.

		Latex	
		+	-
Premier EIA	+	108	6*
	-	0	252

Sensitivity 100%
Specificity 98%
Agreement 98%

*In four of six discrepancies listed above, previous or subsequent specimens confirmed that the patients had cryptococcosis.

The EIA appeared to be more sensitive by detecting low concentrations of cryptococcal antigen at early or late stages of disease. Limits of detection for serotypes A and B have been demonstrated to be 0.63 ng/mL for EIA and 7.6 ng/mL for the latex assay.¹⁰

Patients with AIDS have emerged as a major group susceptible to cryptococcosis. Cryptococcosis is the fourth most common infection complicating AIDS.² A comparison of clinical diagnosis and Premier Cryptococcal Antigen results in an AIDS patient population is listed below.

		Clinical Diagnosis Cryptococcosis	
		+	-
Premier EIA	+	44	2
	-	0	25

ASSAY SPECIFICITY

The following list represents organisms that were negative when tested in the EIA:

Microorganisms tested for Cross-reactivity

Bacteria	Fungal Antigen Preparation	Virus	Yeast
<i>Escherichia coli</i> K1	<i>Aspergillus flavus</i>	Coxsackie A-16, B-5	<i>Candida albicans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Echovirus II	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> 301, 362	<i>Aspergillus niger</i>	Poliovirus I, II, III	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Coccidioides immitis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan strain 1	<i>Histoplasma capsulatum</i>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
<i>Streptococcus agalactiae</i>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			

The only organism found to cross-react in the EIA was *T. beigeli*. This organism is not likely to be found in typical specimens being tested for cryptococcal antigen.⁹

ASSAY PRECISION

Intra-assay Variability – 16 replicates of 3 known positive sera were tested in one assay to determine the intra-assay reproducibility.

Sample	Mean Absorbance	% C.V.
1	0.67	2.1
2	1.74	2.2
3	2.70	3.0

Coefficients of Variation for the same 3 samples using the screening assay with dropper-tips (16 replicates each) were 12, 3.5, and 3.0% respectively.

Inter-assay Variability – 16 replicates of 3 known positive sera were tested in multiple assays by more than one operator.

Sample	Mean Absorbance	% C.V.
4	0.27	11.8
5	0.73	11.5
6	1.76	7.2

Coefficients of Variation for the same 3 samples using the screening assay with dropper-tips (16 replicates each) were 30, 5.8, and 18.9% respectively.

ITALIANO

PREMIER™
CRYPTOCOCCAL
ANTIGEN

REF Numero di catalogo 602096 IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

Test immunoenzimatico per la ricerca di antigene criptococcico nel siero e nel liquido cefalorachidiano

FINALITÀ D'USO

Premier Cryptococcal Antigen è un test immunoenzimatico (EIA), di screening o semi-quantitativo, per la ricerca dell'antigene capsulare polisaccaridico di *Cryptococcus neoformans* nel siero o nel liquido cefalorachidiano (CSF).

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

La criptococcosi, causata dal lievito capsulato *C. Neoformans*, è caratterizzata da un'infezione primaria, spesso asintomatica, localizzata a livello polmonare.¹ Sebbene *C. Neoformans* possa infettare qualsiasi organo, le complicanze più severe si hanno quando il microorganismo invade il sistema nervoso centrale dei pazienti immunodepressi.¹⁻³ In natura esistono quattro sierotipi principali (A-D), tuttavia circa l'80-85% dei ceppi isolati appartiene al sierotipo A oppure al B.⁴

La rilevazione della presenza di antigene criptococcico nel siero o nel liquor è un mezzo molto utile per la diagnosi della meningite criptococcica.^{1-3,7,8} Quando vengono esaminati sia il siero che il liquor la sensibilità della ricerca dell'antigene è superiore al 90%.^{1,2,8} La ricerca dell'antigene è più sensibile rispetto all'esame microscopico a fesco con inchiostro di china^{5,8} e rappresenta un validissimo aiuto per la diagnosi quando l'esame colturale è negativo.⁸

La determinazione dell'andamento del titolo antigenico ha valore prognostico e viene utilizzata per monitorare l'efficacia della terapia farmacologica.^{1,2,5,6}

Il test Premier Cryptococcal Antigen è in grado di rilevare la presenza di tutti e quattro i sierotipi di *Cryptococcus* eventualmente presenti nei campioni biologici.

PRINCIPIO DEL TEST

Il test Premier Cryptococcal Antigen EIA utilizza anticorpi policlonali anti-criptococco adsorbiti su pozzetti microtiter ed un sistema di ricerca basato su anticorpi monoclonali coniugati con perossidasi. Se il campione contiene antigene criptococcico si formerà un complesso anticorpo di cattura-antigene-coniugato. Dopo lavaggio per allontanare l'eccesso di coniugato, si aggiunge il substrato: in presenza di coniugato enzimatico legato all'antigene si avrà uno sviluppo di colore che è proporzionale alla quantità di antigene contenuta nel campione.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

1. **Premier Coniugato enzimatico** – Anticorpi monoclonali specifici anti-antigene criptococcico, marcati con perossidasi di rafano, in soluzione tampone contiene thimerosal (0,02%) come conservante.
2. **Premier Soluzione di lavaggio II 20X** – Soluzione tampone 20X volte concentrata, contiene thimerosal (0,2%) come conservante.
3. **Premier Substrato II** – Soluzione tampone contenente perossido di urea e tetrametilbenzidina.
4. **Premier Soluzione di arresto II** – Acido solforico 2N. **ATTENZIONE:** evitare il contatto con la pelle. Risciacquare con acqua se si verifica contatto.
5. **Premier Controllo Positivo** – Antigene criptococcico in soluzione tampone contiene thimerosal (0,01%) e gentamicina (0,16%) come conservante.
6. **Premier Diluente per i campioni** – Soluzione tampone contiene thimerosal (0,02%) come conservante.
7. **Premier Pozzetti microtiter adsorbiti con anticorpi** – Strisce di micropozzetti, frazionabili singolarmente, adsorbiti con anticorpi policlonali specifici per antigene criptococcico.
8. **Supporto per pozzetti microtiter.**

Il numero massimo di test eseguibili con questo kit è indicato sulla confezione esterna.

MATERIALI NON FORNITI

1. Pipettrici in grado di erogare 50 µL, 100 µL e 200 µL.
2. Provette (12 x 75 mm) per allestire le diluizioni dei campioni.
3. Acqua distillata o deionizzata.
4. Lettore EIA per micropiastre dotato di filtri per la lettura a 450 nm oppure a 450/630 nm.
5. Spruzzetta per i lavaggi oppure apparecchio automatico per il lavaggio delle piastre EIA.
6. Timer.
7. Cilindro graduato per preparare la soluzione di lavaggio diluita (1X).

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono destinati esclusivamente ad uso diagnostico *in vitro*.
2. I campioni dei pazienti possono contenere agenti infettivi e devono pertanto essere maneggiati ed eliminati come materiali potenzialmente pericolosi. Indossare guanti monouso durante il trattamento dei campioni e l'esecuzione del test.
3. Tutti i reagenti dovrebbero essere delicatamente mescolati e portati a temperatura ambiente prima dell'uso.
4. Non scambiare reagenti appartenenti a lotti differenti né utilizzare reagenti scaduti.
5. Tenere i flaconcini in posizione verticale per assicurare l'erogazione dell'esatta quantità dei reagenti.
6. Richiudere ciascun flaconcino con il tappo colorato corrispondente.
7. Il Controllo Positivo contiene antigene criptococcico inattivato. Questo reagente, il tampone di lavaggio utilizzato, i pozzetti usati, ecc. Devono essere eliminati come materiale potenzialmente infettivo. I supporti per i micropozzetti possono essere disinfettati ed utilizzati per successivi test.
8. Evitare il contatto della Soluzione di arresto (acido solforico 2N) con la pelle: risciacquare immediatamente con acqua se tale contatto dovesse verificarsi.
9. **I micropozzetti non utilizzati devono essere riposti nella busta fornita che deve essere richiusa. E' molto importante proteggere le strisce dall'umidità.**
10. Evitare schizzi mentre si distraggono i campioni nei pozzetti: per ottenere ciò si consiglia di introdurre il puntale della pipetta fino a metà circa della profondità del pozzetto e di indirizzare il flusso di liquido verso le pareti dello stesso.
11. Eseguire i lavaggi come descritto nella procedura. **Un lavaggio non corretto può falsare i risultati.**
12. I tempi di incubazione e la concentrazione dei reagenti sono stati ottimizzati per ottenere la massima sensibilità e specificità. Evitare ogni variazione nei suddetti tempi di incubazione o nelle diluizioni.
13. Non conservare i campioni in un congelatore a sbrinamento automatico. Ripetute operazioni di congelamento e scongelamento dei campioni possono alterare i risultati del test.

FRASI DI RISCHIO E CONSIGLI DI PRUDENZA

Sulfuric Acid

Soluzione di arresto II – Xi Irritante

FRASI DI RISCHIO

R:36/38 Irritante per gli occhi e la pelle

Metanolo

Substrato II - F – altamente infiammabile, T – Tossico

FRASI DI RISCHIO

R:11 Facilmente infiammabile

R:66 L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle

R:20/21/22 Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione

R:39/23/24/25 Tossico: pericolo di effetti irreversibili molto gravi per inalazione, a contatto con la pelle e per ingestione

CONSIGLI DI PRUDENZA

S:45 In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico

(se possibile, mostrargli l'etichetta)

S:36 Usare indumenti protettivi adatti

S:37 Usare guanti adatti

Thimerosal

Soluzione di lavaggio II - Xn Nocivo

FRASI DI RISCHIO

R:33 Rischio di effetti cumulativi

R:20/21/22 Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione

CONSIGLI DI PRUDENZA

S:36 Usare indumenti protettivi adatti

S:37 Usare guanti adatti

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è indicata sull'etichetta esterna. Conservare il kit a 2-8 C e rimetterlo in frigorifero immediatamente dopo l'utilizzo.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

1. Lasciare che tutti i componenti del kit, busta dei micropozzetti inclusa, raggiungano temperatura ambiente prima di iniziare il test.
2. Preparare abbastanza soluzione di lavaggio 1X diluendo 1 parte di Tampone di lavaggio 20X in 19 parti di acqua distillata o deionizzata. Il tampone diluito può essere conservato a temperatura ambiente per un periodo massimo di un mese.

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

1. Fluido Cerebrospinale

- a. Prelevare il campione secondo le metodiche standard in uso (**VEDI PARAGRAFO 2 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**).
- b. Centrifugare a 1000 xg per 15 minuti per allontanare completamente tutti i globuli bianchi ed il rimanente materiale corpuscolato.
- c. Aspirare delicatamente il surnatante e trasferirlo in una provetta sterile, Chiudere la provetta.
- d. I campioni possono essere testati immediatamente, conservati in frigorifero a 2-8 C fino a 3 giorni oppure congelati. Non conservare i campioni in un congelatore a sbrinamento automatico.

2. Siero

- a. Prelevare il campione di sangue secondo le metodiche standard in uso (**VEDI PARAGRAFO 2 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**). Il campione non deve contenere anticoagulanti poiché questi possono alterare il risultato del test.
- b. Lasciar coagulare il sangue per 10 o più minuti a temperatura ambiente nella provetta di raccolta.
- c. Centrifugare a 1000 xg per 10 minuti.
- d. Aspirare delicatamente il siero e trasferirlo in una provetta sterile che viene poi sigillata.
- e. I campioni possono essere testati immediatamente, conservati in frigorifero a 2-8 C fino a 3 giorni oppure congelati. Non conservare i campioni in un congelatore a sbrinamento automatico.

NOTA: Con il test Premier Cryptococcal Antigen non è richiesto alcun pretrattamento dei campioni. Gli studi eseguiti indicano che il trattamento con pronasi o con il calore (56 C, 15 minuti) non sembra interferire negativamente con il risultato del test. Può succedere che a volte la pronasi o il trattamento termico interferiscano con il titolo in EIA. Per tale motivo, se si usa il trattamento con pronasi, è necessario utilizzare lo stesso trattamento su **tutti** i prelievi successivi dello stesso paziente per poter correttamente monitorare l'efficacia della terapia.

I campioni da usare per test futuri devono essere suddivisi in aliquote e congelati, poiché la conservazione per più di 72 ore a 2-8 C può falsare il titolo.

METODICA DI SCREENING

Il test dovrebbe essere eseguito da personale qualificato in base alle regolamentazioni locali.

La metodica di screening può essere eseguita direttamente sul siero o sul liquor preparati secondo le istruzioni precedentemente riportate. Il test di screening serve unicamente per differenziare i campioni positivi da quelli negativi. I valori di assorbanza* ottenuti durante tale test non possono essere utilizzati per calcolare i titoli EIA, per ottenere i quali è necessario eseguire la metodica semi-quantitativa.

1. Preparare un numero di pozzetti sufficiente per i campioni e per due controlli. Inserire i pozzetti nel supporto e registrare la posizione dei singoli campioni in un apposito modulo (**VEDI PARAGRAFO 9 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**).
2. Distribuire 50 µL di ciascun campione, di Diluente per i campioni (Controllo Negativo) ed 1 goccia di Controllo Positivo nei pozzetti corrispondenti. Mescolare agitando delicatamente. **Bisogna fare attenzione per evitare contaminazioni crociate tra i vari campioni, poiché questo può falsare il risultato finale del test.**
3. Incubare a temperatura ambiente (20-30 C) per 10 minuti.
4. Eliminare i campioni da ciascun pozzetto mediante aspirazione oppure capovolgendo i pozzetti e scuotendoli su carta assorbente. Riempire i pozzetti con soluzione di lavaggio diluita 1X (circa 300 µL). Capovolgere i pozzetti e scuoterli su carta assorbente. Ripetere questa operazione di lavaggio tre volte, per un totale di quattro lavaggi (**VEDI PARAGRAFO 11 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**).
5. Distribuire 1 goccia di Coniugato enzimatico in ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente. Incubare a temperatura ambiente (20-30 C) per 10 minuti.
6. Eliminare la soluzione da ciascun pozzetto mediante aspirazione oppure capovolgendo i pozzetti e scuotendoli su carta assorbente. Riempire i pozzetti con soluzione di lavaggio diluita 1X (circa 300 µL). Capovolgere i pozzetti e scuoterli su carta assorbente. Ripetere questa operazione di lavaggio tre volte, per un totale di quattro lavaggi (**VEDI PARAGRAFO 11 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**).

7. Distribuire 2 gocce di Substrato in ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente per 15-30 secondi.
8. Incubare a temperatura ambiente (20-30 C) per 10 minuti.
9. Aggiungere 2 gocce di Soluzione di arresto a ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente ed attendere 2 minuti prima di leggere il risultato.
10. Osservare la reazione:
 - a. Lettura visiva – Leggere il risultato entro 15 minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto.
 - b. Lettura spettrofotometrica – Azzerare il lettore EIA contro aria. Pulire il fondo esterno dei pozzetti con un tovagliolo di carta. Leggere l'assorbanza a 450 nm oppure a 450/630 nm entro 15 minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto.
11. Disinfettare e conservare il supporto per i pozzetti. Eliminare i materiali utilizzati come rifiuti potenzialmente infetti.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Ogni volta che si usa il kit bisognerebbe esaminare ciascun flacone di reagenti per verificare che non presenti segni evidenti di contaminazione microbiologica, di congelamento o di perdite.

Il Controllo Positivo e quello Negativo devono essere inclusi ogni volta che si esegue il test per controllare il corretto funzionamento dei reagenti.

Il valore di assorbanza del Controllo Negativo (Diluyente per i campioni) deve essere > 0,000 e < 0,100 a 450 nm oppure > 0,000 e < 0,070 a 450/630 nm. Il valore di assorbanza del Controllo Positivo sia nella metodica di screening che in quella semi-quantitativa deve essere > 0,700 sia a 450 nm che a 450/630 nm.

Se i valori di assorbanza non corrispondono alla lettura visiva, pulire il fondo esterno dei pozzetti, controllare l'allineamento dei pozzetti nel supporto e quello del supporto stesso e ripetere la lettura.

Si consiglia di trascrivere i risultati di ciascun controllo di qualità in un apposito registro, per mantenere un elevato standard qualitativo e per ottemperare alle norme degli Enti preposti ai controlli.

Qualora si ottengano risultati diversi da quelli previsti ed i reagenti non siano scaduti, si prega di contattare il Servizio Clienti Meridian.

INTERPRETAZIONE DEL TEST DI SCREENING

1. Lettura visiva
Negativo = Incolore
Positivo = Giallo ben definito
Usare un lettore EIA se ci sono problemi nella definizione del colore giallo.
2. Lettura spettrofotometrica a singola lunghezza d'onda (450 nm)
Negativo = $OD_{450} < 0,100$
Indeterminato = $OD_{450} \geq 0,100$ e $< 0,150$
Positivo = $OD_{450} \geq 0,150$
3. Lettura spettrofotometrica a doppia lunghezza d'onda (450/630 nm)
Negativo = $OD_{450/630} < 0,070$
Indeterminato = $OD_{450/630} \geq 0,070$ e $< 0,100$
Positivo = $OD_{450/630} \geq 0,100$

I campioni che danno risultati indeterminati dovrebbero essere rianalizzati; se anche al successivo riesame il risultato rimane indeterminato, si dovrebbe prelevare ed esaminare un secondo campione.

Reazioni molto forti possono dare un precipitato color porpora entro pochi minuti dall'aggiunta della Soluzione di Arresto; tali reazioni devono essere considerate positive.

METODICA SEMI-QUANTITATIVA

Il test dovrebbe essere eseguito da personale qualificato in base alle regolamentazioni locali.

La metodica semi-quantitativa può essere eseguita su tutti i sieri e liquor positivi: tale metodica serve per ottenere i valori di assorbanza necessari per un calcolo accurato del titolo EIA.

A. Diluizioni

Per eseguire la metodica semi-quantitativa si consiglia di procedere all'allestimento delle seguenti diluizioni: mescolare 100 µL di campione con 100 µL di Diluyente in una provetta contrassegnata con il numero 1 e agitare il tutto 1-3 secondi sul vortex. Partendo da questa soluzione, preparare le successive diluizioni in base 5 nel modo seguente:

1. Distribuire 200 µL di Diluyente in quattro provette contrassegnate da 2 a 5.
 2. Utilizzando un puntale pulito, trasferire 50 µL del campione diluito dalla provetta 1 alla 2 e mescolare bene.
 3. Trasferire 50 µL di soluzione dalla provetta 2 alla 3 e mescolare bene. Ripetere questa operazione fino alla provetta 5. Se necessario, si possono preparare ulteriori diluizioni in base 5.
- Le diluizioni finali sono: 1:2 1:10 1:50 1:250 1:1250

B. Metodica

Per una maggiore precisione, tutti i reagenti devono essere distribuiti mediante pipettatrici: utilizzare i contagocce dei flaconi per versare la quantità necessaria di ciascun reagente (vedi tabella successiva) in una provetta pulita e poi distribuire nei pozzetti il volume esatto mediante la pipettrice.

NOTA: Non togliere i contagocce dai flaconi dei reagenti, per non causare eventuali contaminazioni che potrebbero comprometterne la funzionalità.

Numero di gocce necessarie

	Coniugato	Substrate	Soluzione d'arresto
1 Campione (7 pozzetti)	7	22	12
2 Campioni (12 pozzetti)	11	35	19
3 Campioni (17 pozzetti)	15	49	27
4 Campioni (22 pozzetti)	19	62	30
10 Campioni (52 pozzetti)	42	143	79

1. Predisporre un numero di pozzetti sufficiente per le diluizioni dei campioni e per due controlli (uno Positivo ed uno Negativo). Inserire i pozzetti nel supporto e registrare la posizione dei singoli campioni in un apposito modulo (**VEDI PARAGRAFO 9 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**).
2. Distribuire 50 µL di ciascuna diluizione, di Diluyente (controllo negativo) e di Controllo Positivo in pozzetti separati. Mescolare agitando delicatamente. **Bisogna fare attenzione per evitare contaminazioni crociate tra i vari campioni, poichè questo può falsare il risultato finale del test.**
3. Incubare a temperatura ambiente (20-30 C) per 10 minuti.
4. Eliminare i campioni da ciascun pozzetto mediante aspirazione oppure capovolgendo i pozzetti e scuotendoli su carta assorbente. Riempire i pozzetti con soluzione di lavaggio diluita 1X (circa 300 µL). Capovolgere i pozzetti e scuoterli su carta assorbente. Ripetere questa operazione di lavaggio tre volte, per un totale di quattro lavaggi (**VEDI PARAGRAFO 11 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**).
5. Distribuire 50 µL di Coniugato enzimatico in ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente. Incubare a temperatura ambiente (20-30 C) per 10 minuti.
6. Eliminare la soluzione da ciascun pozzetto mediante aspirazione oppure capovolgendo i pozzetti e scuotendoli su carta assorbente. Riempire i pozzetti con soluzione di lavaggio diluita 1X (circa 300 µL). Capovolgere i pozzetti e scuoterli su carta assorbente. Ripetere questa operazione di lavaggio tre volte, per un totale di quattro lavaggi (**VEDI PARAGRAFO 11 DELLA SEZIONE PRECAUZIONI**).
7. Distribuire 100 µL di Substrato in ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente per 15-30 secondi.
8. Incubare a temperatura ambiente (20-30 C) per 10 minuti.
9. Aggiungere 100 µL di Soluzione di arresto a ciascun pozzetto. Mescolare agitando delicatamente ed attendere 2 minuti prima di leggere il risultato.
10. Lettura spettrofotometrica – Azzerare il lettore EIA contro aria. Pulire il fondo esterno dei pozzetti con un tovagliolo di carta. Leggere l'assorbanza a 450 nm oppure a 450/630 nm entro 15 minuti dall'aggiunta della Soluzione di arresto.
11. Disinfettare e conservare il supporto per i pozzetti. Eliminare i materiali utilizzati come rifiuti potenzialmente infetti.

INTERPRETAZIONE DEL TEST SEMI-QUANTITATIVO

NOTA: Si consiglia, anche per la metodica semi-quantitativa, di seguire le stesse procedure per il Controllo di Qualità descritte per il test di screening.

Quando si utilizza un lettore a singola lunghezza d'onda per il test semi-quantitativo, i valori di assorbanza del Controllo Negativo (Diluyente) devono essere sottratti da tutti gli altri valori di assorbanza prima di calcolare i titoli.

I valori di assorbanza ottenuti con i lettori a doppia lunghezza d'onda non richiedono nessuna correzione.

A. Selezione dei valori di assorbanza per il calcolo del titolo

1. Utilizzare soltanto i valori di assorbanza ottenuti con la metodica semi-quantitativa.
2. Per il calcolo del titolo in EIA, scegliere il valore di assorbanza più alto, purché sia compreso nell'intervallo di accettabilità, tra 0,100 e 1,500. Se anche la diluizione successiva ha un valore di assorbanza compreso nell'intervallo di accettabilità, allora si procederà al calcolo di entrambi i titoli.
3. Se il campione diluito 1:2 ha un'assorbanza < 0,100, ripetere il test sul campione non diluito.
4. Utilizzando il valore di assorbanza selezionato, calcolare il titolo EIA come indicato al punto B. Se vengono selezionati due valori di assorbanza, calcolare il titolo EIA per ogni valore e fare la media dei risultati.

NOTA: La comparsa di un precipitato color porpora non invalida un risultato positivo, ma i valori di lettura corrispondenti a tali pozzetti non possono essere utilizzati per il calcolo dei titoli in EIA.

B. Calcolo dei titoli

1. Calcolare il titolo in EIA di ogni campione utilizzando la seguente formula:

$$\text{Assorbanza} \times \text{Fattore di moltiplicazione} = \text{Titolo EIA}$$

Fattori di moltiplicazione*

Provetta/pozzetto n.	1	2	3	4	5
Diluizione	1:2	1:10	1:50	1:250	1:1250
Fattore di moltiplicazione	20	100	500	2,500	12,500

*Utilizzare un Fattore di moltiplicazione di 10 per calcolare il titolo EIA del campione non diluito.

2. Esempio di calcolo:
Se, per esempio, un campione avesse un valore di assorbanza pari a 1,2 ad una diluizione di 1:50, il titolo EIA sarebbe: $1,2 \times 500 = 600$, che viene riferito come 1:600

C. Refertazione dei titoli in EAI

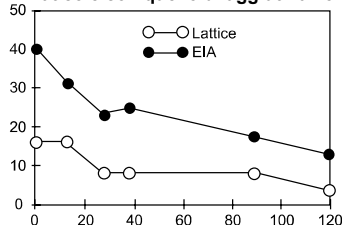
I valori numerici derivanti dal suddetto calcolo possono essere segnalati al medico curante come titoli EIA.

Un titolo maggiore è indicativo di una maggiore concentrazione di antigene. Tuttavia, non si deve tentare di paragonare i titoli ottenuti con il test EIA con quelli derivati da un test di agglutinazione al lattice, poiché a causa della variabilità dei sierotipi e delle diverse tecniche, i titoli EIA sono numericamente diversi da quelli ottenuti con il lattice. Diminuzioni del titolo inferiori a quattro volte non sono considerate significative dal punto di vista clinica.⁶

VALORI ATTESI

La presenza di antigene criptococcico nel liquor o nel siero di pazienti non sottoposti a terapia antimicrobica è indicativa di infezione in atto.¹⁻³ Il risultato del test Premier Cryptococcal Antigen ha valore sia diagnostico che prognostico, poiché la concentrazione di antigene aumenta con il progredire della malattia e diminuisce nel caso in cui il trattamento farmacologico si riveli efficace.^{1,2,5,6} La mancata diminuzione del titolo può quindi essere un segnale di inadeguatezza del trattamento terapeutico. Tuttavia, il titolo antigenico può rimanere a livelli elevati per lunghi periodi di tempo anche in pazienti trattati ed anche laddove non sia possibile dimostrare la presenza di microrganismi vitali.⁸

Comparazione tra i titoli ottenuti nello stesso paziente con il metodo immunoenzimatico e con quello di agglutinazione al lattice



La valutazione dei titoli ottenuti con il metodo semi-quantitativo (sia in EIA che con agglutinazione al lattice) consente un costante monitoraggio sia della progressione della malattia sia dell'efficacia del trattamento in un singolo paziente. I dati derivati dagli studi clinici indicano che il test Premier Cryptococcal Antigen rappresenta un metodo estremamente valido per monitorare l'efficacia della terapia antimicrobica.

I pazienti affetti da AIDS possono avere titoli antigenici in EIA estremamente elevati, per cui la diluizione consigliata nella metodica potrebbero non essere adeguate per calcolare il titolo: in questo caso si possono allestire ulteriori diluizioni in base 5.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Il test Premier Cryptococcal Antigen è stato ottimizzato per l'uso con campioni di siero e di liquor. Si consiglia di non utilizzare il kit con altri tipi di campioni.

Un risultato negativo non esclude a priori la diagnosi di criptococcosi, specialmente se è stato esaminato un solo campione e se il paziente mostra una sintomatologia riferibile a quella della criptococcosi.

Un risultato positivo indica la presenza di antigene criptococcico; tuttavia, i risultati ottenuti dovrebbero essere valutati dal medico curante, come per tutti gli altri test *in vitro*, alla luce del quadro clinico del paziente e del risultato di tutti gli altri esami eseguiti.

Reazioni crociate con altri microrganismi sono state segnalate, con il test di agglutinazione al lattice,⁹ in un solo caso, in cui è stata segnalata una falsa positività causata dalla presenza di *Trichosporon beigeli*. E' teoricamente possibile che lo stesso tipo di reazioni crociate si verifichino anche con il test EIA.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PRESTAZIONI

Il test Premier Cryptococcal Antigen è stato valutato presso due importanti laboratori ospedalieri negli Stati Uniti (279 campioni) e presso la Meridian Bioscience, Inc. (88 campioni, compreso un campione con risultato indeterminato, che non è stato possibile ritestare a causa della ridotta quantità di materiale a disposizione, per cui non è stato incluso nella valutazione finale dei dati). Il test di agglutinazione al lattice CALAS® è stato utilizzato come metodica di riferimento. La tabella successiva riassume i risultati ottenuti nel corso di questi studi.

		Agglutinazione al lattice	
		+	-
Premier	+	108	6*
EIA	-	0	252

Sensibilità 100%
Specificità 98%
Concordanza 98%

* In quattro dei sei casi con risultati discrepanti è stato possibile rivelare la presenza di antigene criptococcico in campioni precedenti o successivi dello stesso paziente.

Il test EIA si è rivelato molto più sensibile rispetto a quello di agglutinazione al lattice, soprattutto nella rilevazione di basse concentrazioni di antigene nelle fasi iniziali oppure tardive della malattia. E' stato inoltre dimostrato che i limiti di rilevazione per i sierotipi A e B sono i seguenti: 0,63 ng/mL per l'EIA e 7,6 ng/mL per il test di agglutinazione¹⁰

I pazienti affetti da AIDS rappresentano la categoria più esposta al rischio di contrarre la criptococcosi, che attualmente viene classificata al quarto posto come frequenza tra le infezioni opportunistiche che colpiscono questi soggetti.² I dati osservati durante uno studio comparativo tra i risultati ottenuti con la diagnosi clinica di criptococcosi e quelli ottenuti con il test Premier Cryptococcal Antigen sono riassunti nella seguente tabella:

		Diagnosi clinica	
		+	-
Premier	+	44	2
EIA	-	0	25

SPECIFICITÀ DEL TEST

Il seguente elenco raggruppa tutti i microrganismi che hanno dato un risultato negativo quando sottoposti ad esame con il test immunoenzimatico.

Microrganismi testati per reazioni crociate

Batteri	Antigeni fungini	Virus	Leiviti
<i>Escherichia coli</i> K1	<i>Aspergillus flavis</i>	Coxsackie A-16, B-5	<i>Candida albicans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Echovirus II	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> 301.362	<i>Aspergillus niger</i>	Poliiovirus I, II, III	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Coccidioides immitis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan strain 1	<i>Histoplasma capsulatum</i>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
<i>Streptococcus agalactiae</i>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			

L'unico microrganismo che ha dimostrato reazioni crociate nel corso del test EIA è stato *T. beigeli*. Tale microrganismo non è di frequente riscontro nei campioni solitamente utilizzati per la ricerca di antigene criptococcico.⁹

PRECISIONE DEL TEST

Variabilità intra-esame – Sedici repliche di 3 campioni sicuramente positivi sono state esaminate nel corso di un singolo test per valutare la riproducibilità intra-esame dei risultati.

Campione	Assorbanza media	% C.V.
1	0,67	2,1
2	1,74	2,2
3	2,70	3,0

I Coefficienti di Variazione per gli stessi tre campioni (16 repliche per ciascun campione), utilizzando la metodica di screening e distribuendo i reagenti mediante i contagocce dei flaconcini, erano rispettivamente 12, 3,5 e 3,0%.

Variabilità inter-esame – Sedici repliche di 3 campioni sicuramente positivi sono state esaminate nel corso di test ripetuti eseguiti da persone diverse per valutare la riproducibilità inter-esame dei risultati.

Campione	Assorbanza media	% C.V.
4	0,27	11,8
5	0,73	11,5
6	1,76	7,2

I Coefficienti di Variazione per gli stessi tre campioni (16 repliche per ciascun campione), utilizzando la metodica di screening e distribuendo i reagenti mediante i contagocce dei flaconcini, erano rispettivamente 30, 5,8 e 18,9%.

FRANÇAIS

PREMIER™
CRYPTOCOCCAL
ANTIGEN

REF Référence du catalogue 602096 IVD Dispositif médical de diagnostic *in vitro*

EIA pour la détection d'antigène cryptococcique dans le sérum et le liquide céphalorachidien (LCR)

APPLICATION

Le test Premier Cryptococcal Antigen est une méthode immunoenzymatique qualitative ou semi-quantitative de détection des antigènes polysaccharidiques capsulaires de *Cryptococcus neoformans* dans le sérum et le liquide céphalorachidien (LCR).

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

La cryptococcose commence typiquement par une infection pulmonaire subclinique due à une levure encapsulée *Cryptococcus neoformans*.⁷ Bien que *Cryptococcus neoformans* puisse infecter tous les organes, les complications les plus graves ont lieu lorsque le micro-organisme envahit le système nerveux central de patients immunodéprimés.¹⁻³ Quatre sérotypes principaux (A à D) existent pour l'antigène polysaccharidique capsulaire. 80 à 85% des souches isolées sont constituées par les sérotypes A et B.⁴

La détection des antigènes cryptococciques dans le sérum ou le LCR est utilisée avec succès dans le diagnostic des méningites associées à une infection par *Cryptococcus neoformans*.^{1,3,7,8} La sensibilité de détection de l'antigène dépasse 90% quand on teste simultanément le sérum et le LCR.^{1,2,8} Elle est meilleure qu'avec la coloration à l'encre de chine.^{5,8} Cette méthode apporte une aide appréciable au diagnostic lorsque la culture est négative.⁸

La détermination des changements relatifs dans les taux d'antigènes a une valeur pronostique et est utilisée pour surveiller l'efficacité du traitement.^{1,2,5,6}

Le test EIA Premier Cryptococcal Antigen détecte tous les sérotypes d'antigènes cryptococciques présents dans les échantillons et fournit un dosage semi-quantitatif fiable.

PRINCIPE DU TEST

Le test Premier Cryptococcal Antigen utilise des anticorps polyclonaux anti-*Cryptococcus* adsorbés sur micropuits et un système de révélation basé sur un anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase. Si les antigènes cryptococciques sont présents, il se forme un complexe entre les antigènes, les anticorps adsorbés et le conjugué enzymatique. Après lavage pour éliminer le conjugué non fixé, on ajoute une solution de substrat. Une coloration se développe en présence de l'enzyme liée. L'intensité de la coloration correspond à la quantité d'antigène cryptococcique présent.

COMPOSITION DU COFFRET

- Premier Conjugué enzymatique:** Anticorps monoclonal spécifique de l'antigène cryptococcique conjugué à la peroxydase de raifort dans un tampon protéique contenant du thimérosal (0,02 %) comme conservateur.
 - Tampon de lavage (Premier 20X Wash Buffer II):** Tampon de lavage concentré contenant du thimérosal (0,2 %) comme conservateur.
 - Substrat (Premier Substrate II):** Solution tampon contenant du peroxyde d'urée et de la tétraméthylbenzidine.
 - Solution d'arrêt (Premier Stop solution II):** Acide sulfurique 2N. **ATTENTION:** Éviter le contact avec la peau. Rincer avec de l'eau le cas échéant
 - Premier Contrôle positif:** Antigène cryptococcique dans un tampon protéique contenant de la gentamycine (0,16%) et du thimérosal (0,01%) comme conservateurs.
 - Premier Diluant échantillons:** Solution protéique contenant du thimérosal (0,02 %) comme conservateur.
 - Premier Micropuits recouverts d'anticorps:** Barrettes en plastique sécables au puits, recouvertes d'anticorps polyclonaux spécifiques de l'antigène cryptococcique.
 - Support de microplaque.**
- Le nombre maximum de déterminations est renseigné sur l'étiquette du coffret.

MATERIEL NON FOURNI

- Pipettes de 50 µL, 100 µL et 200 µL.
- Tubes (12 x 75 mm) pour la dilution des échantillons.
- Eau distillée ou désionisée.
- Lecteur de microplaque pour EIA capable de lire l'absorbance à 450 nm ou 450/630 nm.
- Flacon de lavage ou laveur de microplaques automatique.
- Minuteur.
- Epruvette graduée pour préparer le tampon de lavage 1X.

PRÉCAUTIONS

- Tous les réactifs sont réservés au Diagnostic *in vitro* exclusivement.
- Les échantillons des patients peuvent contenir des agents infectieux et doivent être manipulés et éliminés comme des échantillons potentiellement dangereux. Porter des gants jetables lors de la manipulation des échantillons et de la réalisation du test.
- Tous les réactifs doivent être mélangés doucement avant utilisation et ramenés à température ambiante avant usage.
- Ne pas mélanger les réactifs de coffrets de lots différents et ne pas utiliser de composants du coffret ayant dépassé la date de péremption.
- Tenir les flacons de réactifs à la verticale, à une distance raisonnable au-dessus du puits, lors de la distribution des gouttes pour assurer une taille des gouttes et une distribution régulières.
- Remettre les bouchons sur les flacons correspondants.
- Le réactif de contrôle positif contient des antigènes cryptococciques inactivés. Ce réactif, le tampon de lavage, les micropuits utilisés, etc...doivent être éliminés comme matériel potentiellement infectieux. Le support de microplaque devra être désinfecté et gardé pour des essais ultérieurs.
- Éviter le contact cutané avec la solution d'arrêt (acide sulfurique 2N). Rincer immédiatement avec de l'eau le cas échéant.
- Les micropuits non utilisés doivent être remis dans la pochette refermable. Il est important de protéger les barrettes de l'humidité.**
- Éviter les projections lors de la répartition des échantillons dilués dans les micropuits en plaçant l'embout de la pipette à mi-hauteur dans le puits et en déposant très lentement l'échantillon dilué, le long de la paroi du puits.
- Le lavage des microplaques doit être effectué en suivant précisément la procédure décrite **sous peine d'observer un bruit de fond important.**
- Les temps d'incubation et les concentrations des réactifs ont été optimisés pour obtenir les meilleures sensibilités et spécificités. Éviter toute modification des temps d'incubation ou des dilutions.
- Ne pas stocker les échantillons dans un congélateur à froid ventilé (sans givre). Les congélations et les décongélations répétées des échantillons affectent les résultats du test.

PHRASES DE RISQUE ET CONSEILS DE SÉCURITÉ

Acide Sulfurique

Solution d'arrêt (Premier Stop Solution II) - Xi Irritant

PHRASES DE RISQUE

R:36/38 Irritant pour les yeux et la peau

Méthanol

Substrat (Premier Substrate II) - F –Facilement inflammable, T – Toxique

PHRASES DE RISQUE

R:11 Facilement inflammable

R:66 L'exposition répétée peut provoquer dessèchement ou gerçures de la peau

R:20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion

R:39/23/24/25 Toxique: danger d'effets irréversibles très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion

CONSEILS DE SÉCURITÉ

S: 45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette)

S:36 Porter un vêtement de protection approprié

S:37 Porter des gants appropriés

Thimérosal

Tampon de lavage concentré (Premier 20X Wash Buffer II) - Xn Nocif

PHRASES DE RISQUE

R:33 Danger d'effets cumulatifs

R:20/21/22 Nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion

CONSEILS DE SÉCURITÉ

S:36 Porter un vêtement de protection approprié

S:37 Porter des gants appropriés

CONSERVATION DES REACTIFS

La date de péremption est indiquée sur l'étiquette de la boîte. Conserver le coffret entre 2-8 C et le remettre rapidement au réfrigérateur après chaque utilisation.

PREPARATION DES REACTIFS

- Ramener le coffret à température ambiante avant utilisation, y compris le sachet de micropuits.
- Préparer du tampon de lavage dilué (1X) selon les besoins en diluant un volume de tampon de lavage concentré 20X dans 19 volumes d'eau distillée. Le tampon de lavage 1X peut être conservé un mois à température ambiante.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

1. Liquide céphalorachidien

- Prélever aseptiquement les échantillons en suivant les procédures appropriées (cf **PRECAUTIONS 2.**).
- Centrifuger à 1000 xg pendant 15 minutes pour assurer l'élimination des globules blancs et d'autres éléments.
- Aspirer avec précaution le LCR dans un flacon stérile et sceller.
- L'échantillon peut être traité immédiatement, réfrigéré entre 2-8 C pendant 3 jours ou conservé par congélation. Ne pas stocker dans un congélateur à froid ventilé.

2. Sérum

- Prélever aseptiquement le sang total en suivant les procédures appropriées (cf **PRECAUTIONS 2.**). L'échantillon ne doit pas contenir d'anticoagulants qui invalident le test.
- Laisser coaguler le sang pendant 10 minutes ou plus à température ambiante dans un tube de prélèvement.
- Centrifuger à 1000 xg pendant 10 minutes.
- Aspirer avec précaution le sérum dans un flacon stérile et sceller.
- L'échantillon peut être traité immédiatement, réfrigéré à 2-8 C pendant 3 jours ou conservé par congélation. Ne pas stocker dans un congélateur à froid ventilé.

REMARQUE: Le prétraitement des échantillons n'est pas recommandé pour le test Premier Cryptococcal Antigen EIA. Des études ont montré que le traitement des échantillons par la pronase ou par la chaleur (56 C, 15 minutes) ne semble pas affecter les résultats des dépistages. Parfois, le traitement par la pronase ou par la chaleur peut modifier les titres EIA. De ce fait, si un traitement à la pronase est utilisé, il est indispensable de l'appliquer à **tous** les échantillons prélevés chez un patient pour surveiller un traitement.

Les échantillons destinés à servir à des comparaisons ultérieures devront être aliquotés et congelés, une conservation de plus de 72 heures à 2-8 C pouvant modifier les titres.

PROCEDURE DE REALISATION D'UN DEPISTAGE

Ce test doit être réalisé par un personnel qualifié, en fonction des exigences des réglementations locales.

La procédure de dosage qualitative peut être effectuée directement sur du sérum ou du LCR préparé comme indiqué ci-dessus. Le dépistage permet seulement de différencier les échantillons positifs et négatifs. Les valeurs obtenues avec le dépistage ne peuvent pas être utilisées pour le calcul de titres EIA. La méthode semi-quantitative doit être utilisée pour une détermination exacte.

- Prélever le nombre de micropuits nécessaires pour les échantillons plus deux contrôles. Mettre les micropuits dans le support de barrettes et noter la position de tous les puits (cf **PRECAUTIONS 9.**)
- Mettre 50 µL de chaque échantillon, 50 µL de diluant échantillons (contrôle négatif) et une goutte de contrôle positif dans des micropuits différents. **Faire particulièrement attention à ne pas causer de contaminations croisées entre échantillons, ce qui donnerait des résultats erronés.**

3. Laisser incuber à température ambiante (20-30 C) pendant 10 minutes.
4. Vider la solution des micropuits par aspiration ou en retournant les plaques, puis en tapant les plaques retournées sur du papier absorbant. Tenir fermement le portoir pour éviter de faire tomber les puits. Remplir chaque micropuits avec du tampon de lavage 1X (environ 300 µL). Retourner la plaque et la taper fermement sur du papier absorbant. Répéter le cycle de lavage (éliminer, taper la plaque retournée, remplir) trois fois pour un total de 4 cycles de lavage. (cf PRECAUTION 11.)
5. Ajouter une goutte de conjugué enzymatique dans chaque puits. Mélanger doucement par agitation. Laisser incuber à température ambiante (20-30 C) pendant 10 minutes.
6. Vider la solution des micropuits par aspiration ou en retournant les plaques, puis taper les plaques retournées sur du papier absorbant. Tenir fermement le portoir pour éviter de faire tomber les puits. Remplir chaque micropuits avec du tampon de lavage 1X (environ 300 µL). Retourner la plaque et la taper fermement sur du papier absorbant. Répéter le cycle de lavage (éliminer, taper la plaque retournée, remplir) trois fois pour un total de 4 cycles de lavage. (cf PRECAUTION 11.)
7. Ajouter deux gouttes de substrat dans chaque puits. Mélanger doucement pendant 15 à 20 secondes.
8. Laisser incuber 10 minutes à température ambiante (20-30 C).
9. Ajouter deux gouttes de solution d'arrêt dans tous les puits. Mélanger doucement par agitation et attendre 2 minutes avant de lire.
10. Observer les réactions:
 - a. Détermination visuelle: Lire dans les 15 minutes après addition de la solution d'arrêt.
 - b. Détermination spectrophotométrique: faire le zéro de l'EIA sur l'air (à vide). Essuyer le dessous des micropuits avec un tissu non pelucheux. Lire l'absorbance à 450 nm ou 450/630 nm dans les 15 minutes après addition de la solution d'arrêt.
11. Désinfecter et conserver le support de barrettes. Eliminer les matériaux utilisés comme matériel biologiquement dangereux.

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

À chaque utilisation, les composants du coffret doivent être visuellement examinés pour contrôler l'absence de contamination microbienne, de congélation ou de fuite.

Les contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés avec chaque série d'échantillons pour garantir la qualité des réactifs.

Le contrôle négatif (diluant échantillons) doit être lu $> 0,000$ et $< 0,100$ à 450 nm ou $> 0,000$ et $< 0,070$ à 450/630 nm. L'absorbance du contrôle positif doit être $> 0,700$ aussi bien à 450 nm qu'à 450/630 nm.

Si les valeurs d'absorbance ne correspondent pas aux lectures visuelles, essuyer le dessous des micropuits, contrôler l'alignement des micropuits sur le portoir ainsi que l'alignement du portoir et relire les absorbances.

Il est recommandé de consigner les résultats de chaque contrôle qualité dans un cahier de laboratoire afin de maintenir une qualité élevée des procédures de test, en accord avec les directives des agences réglementaires.

Si vous n'obtenez pas les valeurs attendues, contacter les services techniques de Meridian Bioscience pour assistance.

INTERPRETATION DES RESULTATS DU DEPISTAGE

1. Lecture visuelle
Négatif = incolore
Positif = couleur jaune bien définie
Utiliser un lecteur EIA s'il y a un doute dans la détermination d'une couleur jaune définie.
2. Lecture spectrophotométrique à une seule longueur d'onde (450 nm)
Négatif = $DO_{450} < 0,100$
Indéterminé = $DO_{450} \geq 0,100$ mais $< 0,150$
Positif = $DO_{450} \geq 0,150$
3. Lecture spectrophotométrique à deux longueurs d'onde (450/630 nm)
Négatif = $DO_{450/630} < 0,070$
Indéterminé = $DO_{450/630} \geq 0,070$ mais $< 0,100$
Positif = $DO_{450/630} \geq 0,100$

Les résultats indéterminés doivent être répétés. Si les résultats répétés sont toujours indéterminés, un deuxième échantillon doit être prélevé et testé.

Les réactions positives très fortes peuvent donner un précipité violet quelques minutes après avoir stoppé la réaction. Ces réactions doivent être rendues positives.

PROCEDURE DE REALISATION D'UN DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Ce test doit être réalisé par un personnel qualifié, en fonction des exigences des réglementations locales.

La méthode de dosage semi-quantitative est réalisable sur tout échantillon positif de sérum ou de LCR; elle a pour but de donner des valeurs permettant le calcul de titres EIA exacts.

La méthode recommandée pour le suivi de traitement est de congeler les échantillons et de répéter leur dosage en même temps que les nouveaux échantillons. Ne pas comparer les titres EIA obtenus par dosage sur des séries différentes pour mesurer l'efficacité du traitement. Plusieurs aliquotes de chaque échantillon devront être congelées pour éviter des cycles de congélations/décongélations successives.

A. Dilutions

Les séries de dilutions suivantes sont recommandées pour effectuer un dosage semi-quantitatif. Mélanger 100 µL d'échantillon et 100 µL de diluant échantillons dans un tube à essais, numéroté 1 puis passer au vortex 1-3 secondes. A partir de ce mélange préparer une série de cinq dilutions de la manière suivante:

1. Mettre 200 µL de diluant échantillons dans chaque tube à essais numérotés de 2 à 5.
2. A l'aide d'une pipette propre, transférer 50 µL de l'échantillon dilué du tube 1 vers le tube 2 et bien mélanger (Vortex).
3. Transférer 50 µL du tube 2 vers le tube 3 et bien mélanger. Continuer cette procédure de dilution jusqu'au tube 5. Il est possible de poursuivre ces dilutions au 1:5 (si nécessaire).

Les dilutions finales obtenues sont: 1:2 1:10 1:50 1:250 1:1250

B. Procédure du dosage

Pour augmenter la précision, tous les réactifs doivent être délivrés à l'aide d'une pipette de précision. Utiliser un compte gouttes pour délivrer le nombre de gouttes nécessaires dans un tube à essais propre (voir ci-dessous). Transférer les volumes de réactifs requis dans les puits à l'aide d'une pipette de précision.

REMARQUE: Ne pas enlever les compte-gouttes des flacons de réactifs. Leur contamination modifierait la fiabilité.

Nombre de Gouttes Nécessaires

	Conjugué enzymatique	Substrat	Solution d'arrêt
1 Dosage (7 puits)	7	22	12
2 Dosages (12 puits)	11	35	19
3 Dosages (17 puits)	15	49	27
4 Dosages (22 puits)	19	62	30
10 Dosages (52 puits)	42	143	79

1. Prélever le nombre de micropuits nécessaires pour les échantillons plus 2 contrôles. Mettre les micropuits dans le support de barrettes et noter la position de tous les puits. (cf PRECAUTIONS 9.)
2. Mettre 50 µL de chaque dilution d'échantillon et 50 µL de diluant échantillons (contrôle négatif) dans des puits différents. Mettre 50 µL de contrôle positif dans un puits. **Faire particulièrement attention à ne pas causer de contaminations croisées des échantillons, ce qui donnerait des résultats erronés.**
3. Laisser incuber 10 minutes à température ambiante (20-30 C).
4. Vider la solution des micropuits par aspiration ou en retournant les plaques puis en tapant les plaques retournées sur du papier absorbant. Tenir fermement le portoir pour éviter de faire tomber les puits. Remplir chaque puits avec la solution de lavage 1X (environ 300µL). Retourner la plaque et la taper fermement sur du papier absorbant. Répéter le cycle de lavage (éliminer, taper la plaque retournée, remplir) trois fois pour un total de 4 cycles de lavage (cf PRECAUTION 11.).
5. Déposer 50 µL de Conjugué enzymatique dans chaque puits. Mélanger doucement par agitation. Laisser incuber 10 minutes à température ambiante (20-30 C).
6. Vider la solution des micropuits par aspiration ou en retournant les plaques puis en tapant les plaques retournées sur du papier absorbant. Tenir fermement le portoir pour éviter de faire tomber les puits. Remplir chaque puits avec la solution de lavage 1X (environ 300µL). Retourner la plaque et la taper fermement sur du papier absorbant. Répéter le cycle de lavage (éliminer, taper la plaque retournée, remplir) trois fois pour un total de 4 cycles de lavage (cf PRECAUTION 11.).
7. Déposer 100 µL de Substrat dans chaque puits. Mélanger doucement 15-30 secondes.
8. Laisser incuber 10 minutes à température ambiante (20-30 C).
9. Déposer 100 µL de Solution d'arrêt dans chaque puits. Mélanger doucement et attendre 2 minutes avant la lecture.
10. Détermination spectrophotométrique: faire le zéro de l'EIA sur l'air (à vide). Essuyer le dessous des micropuits avec un tissu non pelucheux. Lire l'absorbance à 450 nm ou 450/630 nm dans les 15 minutes après addition de la solution d'arrêt.
11. Désinfecter et conserver le support de barrettes. Eliminer les matériaux utilisés comme matériel biologiquement dangereux.

INTERPRETATION DU DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

REMARQUES: Les procédures de contrôle qualité indiquées après la procédure de dépistage doivent également être suivies lors de la réalisation d'un dosage semi-quantitatif.

Lors d'une lecture à une seule longueur d'onde, l'absorbance du contrôle négatif (diluant échantillons) doit être soustraite de toutes les autres valeurs d'absorbance avant de calculer le titre EIA.

Il n'y a pas de correction des absorbances à faire lors d'une lecture à deux longueurs d'ondes.

A. Sélection des valeurs d'absorbance pour les calculs.

1. Utiliser seulement les valeurs d'absorbance provenant d'un dosage semi-quantitatif.
2. Choisir la plus grande valeur d'absorbance comprise entre 0,100 et 1,500. Relever la dilution correspondante pour calculer le titre EIA (dilution N).
3. Si la dilution 1:2 de l'échantillon donne une absorbance $< 0,100$, répéter le test à partir de l'échantillon non dilué (sérum pur).
4. En ayant sélectionné l'absorbance, procéder au calcul du titre EIA (cf B ci-après). Si deux absorbances sont sélectionnées, calculez chaque titre et effectuez la moyenne des résultats.

REMARQUE: l'apparition d'un précipité violet correspond bien à un résultat positif, mais les lectures de tels puits ne devront pas être utilisées pour calculer un titre EIA.

B. Calculs

1. Calculer les titres EIA d'un échantillon de la manière suivante:

$$\text{Absorbance} \times \text{Facteur de Multiplication} = \text{titre EIA}$$

Numéro du tube/micropuits	Facteur de multiplication*				
	1	2	3	4	5
Dilution	1:2	1:10	1:50	1:250	1:1250
Facteur de multiplication	20	100	500	2,500	12,500

* Utiliser un facteur de multiplication de 10 pour le calcul d'un titre EIA d'un sérum non dilué.

2. Calcul des échantillons

Un échantillon a une absorbance de 1,2 à la dilution de 1:50, le titre EIA sera de: $1,2 \times 500 = 600$. Le titre sera noté au 1:600.

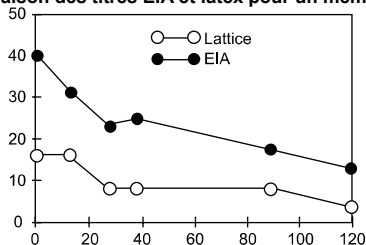
C. Utilisation des titres EIA

Les valeurs obtenues à partir des calculs EIA peuvent être rendues aux cliniciens comme étant des titres EIA. Un titre plus élevé correspond à une concentration plus élevée en antigène. Cependant, il ne faut pas essayer de comparer des titres EIA à des titres latex. A cause des variations de sérotypes et des méthodes de test différentes, les titres EIA ne sont pas numériquement équivalents aux titres latex. Des diminutions en titres de moins de quatre fois ne sont pas considérées comme cliniquement significatives.⁶

VALEURS ATTENDUES

La présence d'antigène cryptococcique dans le LCR ou le sérum de patient non traité est le signe d'une infection en cours.¹⁻³ Le test EIA Premier Cryptococcal Antigen a une valeur diagnostique et pronostique car les concentrations en antigène augmentent lors de la progression de la maladie et diminuent pendant un traitement efficace.^{1,2,5,6} Une absence de diminution des titres peut correspondre à un traitement inadéquat. Cependant, chez certains patients traités, des titres stationnaires peuvent quelquefois persister pendant des périodes prolongées alors qu'aucun organisme viable ne peut être mis en évidence.⁸

Comparaison des titres EIA et latex pour un même patient



L'utilisation principale des valeurs semi-quantitatives obtenues en EIA ou en latex est de suivre l'évolution de la maladie et du traitement chez un malade. Les données ci-dessus suggèrent que le test EIA Premier Cryptococcal Antigen est une méthode efficace de surveillance de l'efficacité d'un traitement.

Les patients atteints de SIDA peuvent avoir des titres EIA très élevés. Les séries de dilutions conseillées peuvent ne pas être adéquates. Faire autant de dilutions supplémentaires au 1:5 que nécessaire.

LIMITES DE LA PROCÉDURE

Le test Premier Cryptococcal Antigen est prévu pour être utilisé avec des échantillons de sérum ou de LCR. L'utilisation de ce test avec d'autres échantillons n'est pas recommandée.

Un test négatif n'exclut pas un diagnostic de cryptococcose, surtout si un seul échantillon a été testé et si le patient montre des signes compatibles avec une cryptococcose.

Un résultat positif implique la présence d'antigène cryptococcique. Cependant, tous les résultats des tests doivent être interprétés dans le cadre des autres données cliniques.

Trichosporon beigellii a montré dans un cas une réaction croisée en technique latex.⁹ Ce cas peut être similaire avec le test EIA.

CARACTERISTIQUES SPÉCIFIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

Le test Premier Cryptococcal Antigen a été évalué dans deux centres médicaux importants aux Etats Unis (279 échantillons) et chez Meridian Bioscience, Inc. (88 échantillons, y compris un échantillon indéterminé). Une quantité insuffisante de ce dernier n'a pas permis de le retester et cet échantillon n'est donc pas repris ci-dessous). Le test d'agglutination latex CALAS® a été utilisé comme dosage de référence. Les résultats combinés des tests sont résumés dans le tableau ci-dessous.

		Latex	
		+	-
Premier	+	108	6*
EIA	-	0	252

Sensibilité 100%
Spécificité 98%
Corrélation 98%

* Dans quatre des six résultats discordants signalés au-dessus, des échantillons précédents ou suivants ont confirmé que ces patients souffraient de cryptococcose.

L'EIA semble être la méthode la plus sensible en détectant les concentrations basses de l'antigène cryptococcique aux stades précoces et avancés de la maladie. Les limites de détection pour les sérotypes A et B ont été établies à 0,63 ng/mL en EIA et à 7,6 ng/mL en agglutination sur latex.¹⁰

Les patients atteints de SIDA sont apparus comme un des principaux groupes à risque de cryptococcose. La cryptococcose est la quatrième infection la plus répandue lors des complications du SIDA.² Une comparaison entre le diagnostic clinique et le test EIA Premier Cryptococcal Antigen chez une population de cas de SIDA est reprise ci-dessous.

Diagnostic clinique de la cryptococcose

		+	-
Premier	+	44	2
EIA	-	0	25

SPECIFICITE DU DOSAGE

La liste suivante donne les micro-organismes ne réagissant pas avec le test EIA.

Bactéries	Micro-organismes testés pour la réactivité croisée	Préparation d'antigènes fongiques	Virus	Levures
<i>Escherichia coli</i> K1		<i>Aspergillus flavus</i>	Coxsackie A-16, B-5	<i>Candida albicans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>		<i>Aspergillus fumigatus</i>	Echovirus II	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> 301,362		<i>Aspergillus niger</i>	Poliovirus I, II, III	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Blastomyces dermatitidis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Coccidioides immitis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan strain 1		<i>Histoplasma capsulatum</i>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>				
<i>Streptococcus agalactiae</i>				
<i>Streptococcus pneumoniae</i>				

Le seul micro-organisme ayant montré une réactivité croisée en EIA est *Trichosporon beigellii*. Il est peu vraisemblable que ce micro-organisme puisse être trouvé dans des échantillons testés pour la recherche d'antigène cryptococcique.⁹

PRECISION DU DOSAGE

Variabilité intra-dosage – 16 réplicats de 3 sérums connus comme positifs ont été testés en un dosage pour établir la reproductibilité intra-dosage.

Echantillon	Absorbance moyenne	C.V. (%)
1	0,67	2,1
2	1,74	2,2
3	2,70	3,0

Les coefficients de variation des trois mêmes échantillons (16 réplicats chacun) avec le test de dépistage avec les compte-gouttes étaient respectivement de 12, 3,5 et 3,0%.

Variabilité inter-dosages – 16 réplicats de 3 sérums connus comme positifs ont été testés au cours de plusieurs séries de tests par plus d'une personne.

Echantillon	Absorbance moyenne	C.V. (%)
4	0,27	11,8
5	0,73	11,5
6	1,76	7,2

Les coefficients de variation des trois mêmes échantillons (16 réplicats chacun) avec le test de dépistage avec les compte-gouttes étaient respectivement de 30, 5,8 et 18,9%.

ESPAÑOL

PREMIER™

CRYPTOCOCCAL ANTIGEN

REF Número de catálogo 602096

IVD Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*

Para detectar antígeno del *Cryptococcus* en suero y en líquido cefalorraquídeo

USO INDICADO

El test de inmunoensayo enzimático (Enzyme immunoassay, EIA) Premier Cryptococcus Antigen es un sistema para detectar la presencia (cualitativo) o para medir la cantidad en forma semi-cuantitativa de los antígenos del lipopolisacárido capsular del *Cryptococcus neoformans*, en suero y en líquido cefalorraquídeo (LCR).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL TEST

La criptococosis tiene un comienzo típico caracterizado por una infección pulmonar subclínica, causada por una levadura encapsulada que abunda en la tierra y que se llama *C. neoformans*.¹ Aunque el *C. neoformans* puede infectar cualquier órgano, las complicaciones más serias ocurren cuando los organismos invaden el sistema nervioso central de los pacientes, con el compromiso del sistema inmune.¹⁻³ Dentro del antígeno del polisacárido capsular existen cuatro serotipos principales: A-D el 80-85% de los organismos aislados están constituido por A ó B.⁴

La detección de los antígenos de cryptococcus en suero o en LCR es usada con bastante éxito en el diagnóstico de la meningitis asociada con infección por *C. neoformans*.^{1,3,7,8} Cuando se analizan tanto suero como LCR la sensibilidad de la prueba de detección de antígeno es mayor del 90%.^{1,2,8} La prueba de detección de antígeno es más sensible que la tinción con tinta china,^{5,8} y constituye una ayuda diagnóstica cuando los cultivos son negativos.⁸

La determinación de los cambios relativos en los niveles de antígeno tiene valor pronóstico y se usa para monitorear la eficacia de la terapia con drogas.^{1,2,5,6}

El test EIA Premier Cryptococcus Antigen detecta y proporciona una determinación semicuantitativa de todos los serotipos antígenicos presentes en las muestras.

FUNDAMENTO DEL TEST)

El test EIA Premier Cryptococcus Antigen utiliza anticuerpos policlonales anti-cryptococcus adsorbidos a micropocillos y un sistema de detección basado en un conjugado de anticuerpo monoclonal ligado a peroxidasa. En caso de que haya anticuerpos de cryptococcus presentes en la muestra, se formará un complejo entre los antígenos, el conjugado enzimático y el anticuerpo adsorbido. Después de lavar para remover el conjugado no ligado, se añade una solución de sustrato. En presencia de la enzima ligada, se desarrollará color. La cantidad de color está relacionada con la cantidad de antígeno de cryptococcus presente.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

1. **Premier Conjugado Enzimático** – Anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno de cryptococcus y conjugado con peroxidasa de rábano en una solución proteica tamponada con timerosal (0.02%) como agente preservante.
2. **Premier Tampón de Lavado II 20X** - Solución tampón de lavado, concentrada u con timerosal (0,2%) como preservante.
3. **Premier Sustrato II** – Solución tamponada que contiene peróxido de urea y tetrametil-bencidina.
4. **Premier Solución de Parada II** – Acido sulfúrico 2N. **PRECAUCIÓN:** Evite el contacto con la piel. En caso de contacto, lave con agua abundante.
5. **Premier Control Positivo** – Antígeno de cryptococcus en solución proteica tamponada que contiene gentamicina (0.16%) y timerosal (0.01%) como agente preservante.
6. **Premier Diluyente de Muestras** – Solución proteica tamponada y con timerosal (0.02%) como agente preservante.
7. **Premier Micropocillos recubiertos con anticuerpos** – Micropocillos plásticos separables recubiertos con anticuerpos policlonales específicos para el antígeno de cryptococcus.
8. **Soporte para las tiras de micropocillos.**

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

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Pipetas con capacidad para dispensar 50 µL, 100 µL y 200 µL.
2. Tubos de ensayo (12 x 75 mm) para diluir la muestra.
3. Agua destilada o desionizada.
4. Espectrofotómetro con capacidad para leer absorbancia a 450 nm o 450/630 nm.
5. Botella de enjuague o lavador automático para placas de ELISA.
6. Cronómetro.
7. Probeta graduada para preparar la solución tampón de lavado 1X.

PRECAUCIONES

1. Utilice todos los reactivos únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Las muestras de los pacientes pueden contener agentes infecciosos y deberán ser manipuladas y desechadas como materiales biológicos potencialmente peligrosos. Utilice guantes desechables mientras maneja muestras de pacientes y realiza el procedimiento del test.
3. Antes de usarlos, agitar todos los reactivos y esperar a que estos alcancen la temperatura ambiente.
4. No intercambie reactivos de kits con distinto número de lote, ni use reactivos después de su fecha de expiración.
5. Sostenga los viales de reactivo verticalmente sobre el pocillo, para asegurar un tamaño de gota y administración apropiado.
6. Asegúrese de colocar correctamente las tapas de color en los viales que les corresponden.
7. El Control Positivo contiene antígeno de cryptococcus inactivado. Este reactivo, al igual que el tampón de lavado, los micropocillos usados, etc., deben ser desechados como materiales biológicos potencialmente peligrosos. El soporte para las tiras de micropocillos debe ser desinfectado y guardado para tests futuros.
8. Evite que la solución de parada (ácido sulfúrico 2N) entre en contacto con la piel. En caso de contacto, enjuague con agua abundante.
9. **Los micropocillos no usados deben colocarse de nuevo en la bolsa re sellable de papel aluminio y cerrarse inmediatamente. Es importante protegerlos de la humedad.**
10. Evite las salpicaduras al dispensar la muestra diluida dentro de los micropocillos colocando la punta de la pipeta de transferencia hasta la mitad del micropocillo y dispensando lentamente hacia abajo por la pared del mismo.
11. Lave el micropocillo exactamente como se indica en el procedimiento del ensayo. **Un lavado inadecuado causará una lectura de fondo elevada.**
12. Los tiempos de incubación y las concentraciones de los reactivos han sido optimizados para garantizar la sensibilidad y especificidad de la prueba. Evite desviarse de los tiempos de incubación o diluciones especificadas.
13. No guarde las muestras en un congelador con descongelación automática. Los ciclos repetitivos de congelación-descongelación de la muestra pueden afectar los resultados de la prueba.

FRASES DE RIESGO Y FRASES DE SEGURIDAD

Ácido sulfúrico

Solución de Parada II - Xi Irritante

FRASES DE RIESGO

R:36/38 Irrita los ojos y la piel

Metanol

Substrato II - F –Altamente Flamable, T – Tóxico

FRASES DE RIESGO

R:11 Fácilmente inflamable

R:66 La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel

R:20/21/22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel

R:39/23/24/25 Tóxico: peligro de efectos irreversibles muy graves por inhalación, contacto con la piel e ingestión

FRASES DE SEGURIDAD

S: 45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrese la etiqueta)

S:36 Úsese indumentaria protectora adecuada

S:37 Úsese guantes adecuados

Timerosal

20X Tampón de Lavado II – Xn Nocivo

FRASES DE RIESGO

R:33 Peligro de efectos acumulativos

R:20/21/22 Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel

FRASES DE SEGURIDAD

S:36 Úsese indumentaria protectora adecuada

S:37 Úsese guantes adecuados

VIABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

La fecha de expiración está indicada en el rótulo del kit. Almacene el kit entre 2-8 C y regrese el kit al refrigerador enseguida termine de realizar el procedimiento.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Antes de utilizarlo, permita que todo el kit, incluyendo la bolsa de los micropocillos, alcance la temperatura ambiente.
2. Prepare una cantidad suficiente de solución de lavado 1X para usar. Por ejemplo, diluya una parte de solución de lavado 20X con 19 partes de agua destilada o desionizada. La solución de lavado 1X puede ser almacenada a temperatura ambiente hasta por un término de un mes.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Líquido cefalorraquídeo (LCR)

- a. Recolecte una muestra de LCR con técnica aséptica y siguiendo los procedimientos establecidos por su institución. **(Vea PRECAUCIÓN # 2)**
- b. Centrifugue a 1000 xg durante 15 minutos para asegurar la remoción de todos los glóbulos blancos y demás partículas.
- c. Cuidadosamente aspire el LCR dentro de un recipiente estéril y selle.
- d. La muestra puede ser analizada inmediatamente, almacenada durante tres días entre 2-8 C, o preservada por congelamiento. No la almacene en un congelador con descongelación automática.

2. Suero

- a. Recolecte la sangre con técnica aséptica y de acuerdo con las normas recomendadas por su institución. **(Vea PRECAUCIÓN # 2)** Es importante que la muestra no sea recolectada con anticoagulantes, pues éstos pueden invalidarla.
- b. Permita que la sangre se coagule, dejándola durante diez minutos o más a temperatura ambiente en el tubo en que se recolectó.
- c. Centrifugue la muestra a 1000 xg durante 10 minutos.
- d. Cuidadosamente aspire el suero dentro de un recipiente estéril y luego séllelo.
- e. La muestra puede ser analizada inmediatamente, almacenada durante tres días entre 2-8 C, o preservada por congelamiento. No la almacene en un congelador con descongelación automática.

NOTA: No se recomienda hacer un tratamiento previo de la muestra antes de realizar el test EIA Premier Cryptococcus Antigen. Los resultados de estudios indican que el tratamiento con pronasa o la inactivación del complemento por calor (56 C, 15 minutos) aparentemente no afectan adversamente los resultados de identificación de antígeno. Ocasionalmente, pronasa o la inactivación por calor alteran los títulos en la prueba EIA. Por lo tanto, si el tratamiento con pronasa es utilizado, es esencial que **todas** las muestras seriadas provenientes de un mismo paciente y obtenidas con el objeto de monitorear la terapia que éste recibe, sean tratadas del mismo modo.

Las muestras que vayan a ser usadas en un futuro deben separarse en alícuotas y congelarse, puesto que el almacenamiento a temperaturas entre 2-8 C durante tiempos mayores a 72 horas puede afectar los títulos.

PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANTÍGENO (CUALITATIVO)

Este ensayo debe ser realizado por personal calificado acorde con las disposiciones de regulación locales para tal finalidad.

El procedimiento para determinar la presencia de antígeno puede realizarse directamente con suero o con LCR preparado como se describió anteriormente. La prueba para detectar antígeno tan sólo tiene como objeto diferenciar las muestras positivas de las negativas. Los valores obtenidos en esta prueba no pueden utilizarse para calcular los títulos en la prueba EIA. Para lograr una determinación más precisa, la prueba semicuantitativa debe ser usada.

- Desprenda un número suficiente de micropocillos para correr todas las muestras y dos controles. Inserte los micropocillos en el sujetador y registre la posición de las muestras (**Vea PRECAUCIÓN # 9**).
- Añada 50 µL de cada muestra, Diluyente de Muestra (control negativo) y una gota de Control Positivo al fondo de cada micropocilo asignado para cada muestra y cada control. **Mezcle agitando suavemente y con cuidado de no contaminar los micropocillos con otras muestras o controles, ya que esto puede causar resultados erróneos.**
- Incube a temperatura ambiente (entre 20-30 C) durante 10 minutos.
- Remueva las muestras dentro de cada micropocilo mediante aspiración, o invirtiendo el soporte con los micropocillos y sacudiéndolo firmemente sobre una toalla de papel absorbente. Enseguida llene cada micropocilo con solución tampón de lavado 1X (aproximadamente 300 µL). Invierta el soporte de nuevo, y sacuda los micropocillos sobre una toalla de papel absorbente. Repita este procedimiento tres veces, hasta completar un total de cuatro lavados (**ver PRECAUCIÓN # 11**).
- Añada 1 gota de Conjugado Enzimático a cada micropocilo. Mezcle agitando suavemente. Incube a temperatura ambiente (entre 20-30 C) durante 10 minutos.
- Remueva la solución dentro de cada micropocilo mediante aspiración, o invirtiendo el soporte con los micropocillos y sacudiéndolo firmemente sobre una toalla de papel absorbente. Enseguida llene cada micropocilo con solución tampón de lavado 1X (aproximadamente 300 µL). Invierta el soporte de nuevo, y sacuda los micropocillos sobre una toalla de papel absorbente. Repita este procedimiento tres veces, hasta completar un total de cuatro lavados (**Vea PRECAUCIÓN # 11**).
- Añada 2 gotas de Solución de Substrato a cada micropocilo. Mezcle agitando suavemente durante 15-20 segundos.
- Incube a temperatura ambiente (entre 20-30 C) durante 10 minutos.
- Añada 2 gotas de Solución de Parada dentro de cada micropocilo. Mezcle agitando suavemente y espere 2 minutos antes de leer.
- Observe las reacciones:
 - Determinación Visual: lea dentro de un plazo de 15 minutos después de añadir la Solución de Parada.
 - Determinación Espectrofotométrica: ponga el espectrofotómetro en Blanco con aire. Limpie el fondo de los micropocillos con un papel tisú que no desprenda pelusa. Lea la absorbancia a 450 nm o con un filtro de 450/630 nm dentro de un plazo de 15 minutos después de añadir la Solución de parada.
- Desinfecte y guarde el soporte para los micropocillos. Deseche todos los materiales usados durante el test como si éstos fuesen material biológico potencialmente infeccioso.

CONTROL DE CALIDAD

En el momento de ser usados, los componentes del kit deben examinarse visualmente para determinar la presencia de signos claros de contaminación microbiana, congelamiento o derrame.

Los controles positivo y negativo deben ser incluidos en cada corrida de muestras en serie, para así asegurar la calidad de los reactivos.

La absorbancia del control negativo (Diluyente de Muestras) deberá ser $> 0,000$ y $< 0,100$ a 450 nm, ó $> 0,000$ y $< 0,070$ a 450/630 nm. La absorbancia del Control Positivo deberá ser $> 0,700$ ya sea a 450 nm o a 450/630 nm.

En caso de que los valores de absorbancias no correspondan a las lecturas visuales, limpie el fondo de los micropocillos, chequee la alineación de los micropocillos dentro el soporte, al igual que la alineación del soporte y vuelva a leer.

Se sugiere que los resultados de cada prueba de control de calidad sean registrados en un libro de registro apropiado para facilitar el monitoreo de los procedimientos del test, y para cumplir con los requisitos de las agencias reguladoras.

En caso de que los resultados observados no sean los esperados, por favor, póngase en contacto con el Centro de Asistencia Técnica de Meridian.

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA PARA LA PRESENCIA DE ANTÍGENO CAPSULAR (CUALITATIVO)

- Lectura visual:
 - Negativa = Incolora
 - Positiva = Color amarillo obvio
 - Utilice un espectrofotómetro en caso de que haya duda para determinar la presencia de color amarillo obvio.
- Espectrofotómetro, Longitud de Onda Única: (450 nm)
 - Negativo = $DO_{450} < 0,100$
 - Indeterminado = $DO_{450} \geq 0,100$ y $\leq 0,150$
 - Positivo = $DO_{450} \geq 0,150$
- Espectrofotómetro, Longitud de Onda Dual (450/630 nm)
 - Negativo = $DO_{450/630} < 0,070$
 - Indeterminado = $DO_{450/630} \geq 0,070$ y $< 0,100$
 - Positivo = $DO_{450/630} \geq 0,100$

Los resultados indeterminados deben repetirse. Si después de repetirse, éstos continúan siendo indeterminados, una nueva muestra debe ser tomada y vuelta a correr. Las reacciones extremadamente fuertes pueden producir un precipitado de color violeta a los pocos minutos después de parar la reacción; estas reacciones deben interpretarse como positivas.

PROCEDIMIENTO POR MÉTODO SEMI-CUANTITATIVO

Este ensayo debe ser realizado por personal calificado acorde con las disposiciones de regulación locales para tal finalidad.

El procedimiento Semi-cuantitativo del test puede ser realizado en cualquier muestra positiva de suero o LCR. Este procedimiento tiene como objeto generar valores necesarios para poder calcular con precisión el título de anticuerpos en la prueba EIA.

En caso de que la terapia con drogas tenga que ser monitoreada utilizando muestras seriadas, es preferible repetir cada muestra al mismo tiempo que se está titulando la nueva muestra. No se recomienda utilizar títulos de anticuerpos obtenidos en ensayos previos de EIA y compararlos directamente con los obtenidos en ensayos nuevos, con el objeto de monitorear la terapia. Pare prevenir que las muestras tengan que ser sometidas a ciclos repetitivos de congelación-descongelación, las muestras deben ser divididas en alícuotas y luego congeladas.

A. Diluciones

La siguiente serie de diluciones es recomendada al realizar el procedimiento Semi-cuantitativo: combine 100 µL de muestra con 100 µL de Diluyente de Muestra en un tubo de ensayo marcado #1 y mezcle con un vórtex durante 1-3 segundos. A partir de la mezcla dentro de este tubo prepare una serie de diluciones quintuplas del siguiente modo:

- Coloque 200 µL de Diluyente de Muestras en cada uno de 4 tubos marcados 2-5.
- Con una pipeta limpia, transfiera 50 µL de la muestra del paciente diluida en el tubo #1 dentro del tubo #2 y mezcle bien.
- Transfiera 50 µL del tubo #2 dentro del tubo #3 y mezcle bien. Continúe este procedimiento de dilución hasta el tubo #5. Es posible hacer diluciones adicionales 1:5 si es necesario.

Las diluciones finales son: 1:2 1:10 1:50 1:250 1:1250

B. Procedimiento del Test

Para mayor precisión, todos los reactivos deben ser adicionados con un pipeteador. Utilice la botella con gotero para añadir el número de gotas requerido (ver más adelante) dentro de un tubo de ensayo limpio. Transfiera los volúmenes de reactivos requeridos dentro de los micropocillos utilizando un pipeteador.

NOTA: No remueva las puntas de los goteros de las botellas de reactivos, ya que la contaminación puede comprometer la actividad de los mismos.

Número de gotas requeridas

	Conjugado enzimático	Substrato	Solución de parada
1 Título (7 micropocillos)	7	22	12
2 Títulos (12 micropocillos)	11	35	19
3 Títulos (17 micropocillos)	15	49	27
4 Títulos (22 micropocillos)	19	62	30
10 Títulos (52 micropocillos)	42	143	79

- Desprenda un número suficiente de micropocillos para colocar las muestras diluidas y dos controles. Insértelos dentro del sujetador para micropocillos y registre la posición de las muestras (**ver PRECAUCIÓN 9**).
- Añada 50 µL de cada muestra diluida, Control Positivo y Diluyente para Muestra (control negativo) al fondo de cada micropocilo asignado para los mismos, **teniendo cuidado de no contaminar los micropocillos con otras muestras o controles, ya que esto puede causar resultados erróneos.**
- Incube a temperatura ambiente (entre 20-30 C) durante 10 minutos.
- Remueva la solución dentro de cada micropocilo mediante aspiración, o invirtiendo el soporte con los micropocillos y sacudiéndolo firmemente sobre una toalla de papel absorbente. Enseguida llene cada micropocilo con solución tampón de lavado 1X (aproximadamente 300 µL). Invierta el soporte de nuevo, y sacuda los micropocillos sobre una toalla de papel absorbente. Repita este procedimiento tres veces, hasta completar un total de cuatro lavados (**ver PRECAUCIÓN 11**).
- Añada 50 µL de Conjugado Enzimático dentro de cada micropocilo, incluyendo los de control. Mezcle agitando suavemente. Incube a temperatura ambiente (entre 20-30 C) durante 10 minutos.
- Remueva la solución dentro de cada micropocilo mediante aspiración, o invirtiendo el soporte con los micropocillos y sacudiéndolo firmemente sobre una toalla de papel absorbente. Enseguida llene cada micropocilo con solución tampón de lavado 1X (aproximadamente 300 µL). Invierta el soporte de nuevo, y sacuda los micropocillos sobre una toalla de papel absorbente. Repita este procedimiento tres veces, hasta completar un total de cuatro lavados (**ver PRECAUCIÓN 11**).
- Añada 100 µL de Solución de Substrato a cada micropocilo. Mezcle agitando suavemente durante 15-20 segundos.
- Incube a temperatura ambiente (entre 20-30 C) durante 10 minutos.
- Añada 100 µL de Solución de Parada dentro de cada micropocilo. Mezcle agitando suavemente y espere 2 minutos antes de leer.
- Determinación Espectrofotométrica:
 - Ponga el espectrofotómetro en blanco con aire. Limpie el fondo de los micropocillos con un papel tisú que no desprenda pelusa.
 - Lea la absorbancia a 450 nm o con un filtro de 450/630 nm dentro de un plazo de 15 minutos después de añadir la Solución de Parada.
- Desinfecte y guarde el soporte para los micropocillos. Deseche todos los materiales usados durante el test como si éstos fuesen material biológico potencialmente infeccioso.

INTERPRETACIÓN SEMI-CUANTITATIVA DE LA PRUEBA

NOTA: Los procedimientos de Control de Calidad anotados después de Procedimiento para determinar la presencia de antígeno deben ser realizados cuando se hace la determinación semi-cuantitativa del test.

Cuando se emplea un espectrofotómetro de Longitud de Onda Única para obtener los resultados del test semi-cuantitativo, la absorbancia del control negativo (Diluyente para Muestras) debe restarse de todos los demás valores de absorbancias antes de calcular el título de anticuerpos en la prueba EIA.

Los valores de absorbancia obtenidos con un espectrofotómetro de Longitud de Onda Dual no necesitan ser ajustados.

A. Selección de valores de absorbancia para hacer los cálculos

- Para calcular el título de anticuerpos en el test, utilice sólo valores de absorbancia que provengan del análisis semi-cuantitativo.
- Seleccione el valor de absorbancia más alto dentro del rango permitido (entre 0,100 y 1,500) para calcular el título EIA. Si la dilución siguiente también genera un valor de absorbancia que se encuentra dentro del rango aceptable, este valor también deberá ser seleccionado.
- Si la dilución 1:2 de la muestra genera un valor de absorbancia < que 0,100, repita el test con la muestra sin diluir.
- Utilizando la absorbancia seleccionada, calcule el título EIA como se delinea en la sección B a continuación. Si se han seleccionado dos valores de absorbancias, calcule cada título por separado y haga un promedio de los resultados.

NOTA: La aparición de un precipitado de color violeta no invalida un resultado positivo; sin embargo, las lecturas obtenidas a partir de estos micropocillos no pueden ser utilizadas para calcular un título EIA.

B. Cálculos

- Calcule el título EIA para una muestra en particular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de Absorbancia} \times \text{Factor de Multiplicación} = \text{Título EIA}$$

Tubo/micropocillo número	Factores de Multiplicación*				
	1	2	3	4	5
Dilución	1:2	1:10	1:50	1:250	1:1250
Factor de Multiplicación	20	100	500	2,500	12,500

* Utilice un Factor de Multiplicación de 10 para calcular el título de anticuerpos en la prueba EIA de una muestra sin diluir.

- Cálculos para una muestra:

Por ejemplo, si la muestra de un paciente dio una lectura de absorbancia de 1,2 a una dilución de 1:50, el título EIA a reportar sería:
 $1,2 \times 500 = 600$ lo cual se reportaría como por 1:600

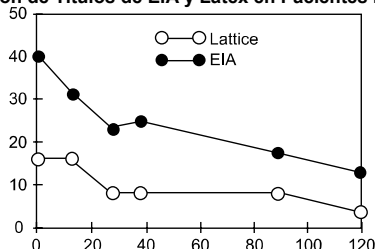
C. Reportando títulos EIA

Los números derivados de los cálculos en la prueba EIA pueden ser reportados al médico como el título EIA. Un título más alto refleja una concentración mayor de antígeno. Sin embargo, no trate de comparar un título de EIA con un título obtenido en una prueba de aglutinación con látex. Los títulos EIA numéricamente no son equivalentes a los títulos obtenidos en las pruebas de aglutinación con látex, debido a variaciones en los serotipos y a diferencias en las tecnologías de la prueba. No se considera que tengan importancia clínica las disminuciones en los títulos que sean menores que disminuciones cuádruples.⁶

VALORES ESPERADOS

El antígeno de cryptococcus en suero o en LCR del paciente no tratado es indicativo de una infección activa.¹⁻³ El test Premier Cryptococcus Antigen deberá tener tanto valor diagnóstico como valor pronóstico, puesto que las concentraciones de antígeno aumentan durante el progreso de la enfermedad y disminuyen durante el tratamiento con éxito.^{1,2,5,6} Cuando los títulos no disminuyan, esto puede indicar que la terapia es inadecuada. Sin embargo, en algunos pacientes tratados, los niveles de antígeno pueden permanecer inalterados durante períodos largos de tiempo, durante los cuales no puede demostrarse la presencia de organismos viables.⁸

Comparación de Títulos de EIA y Látex en Pacientes Individuales



La aplicación primaria de los valores semi-cuantitativos derivados de los tests con látex o EIA siguen el curso de la enfermedad y tratamiento de cada paciente. Estos datos sugieren que el test Premier Cryptococcal Antigen sería un método valioso para monitorear la eficacia de las terapias con drogas.

Los pacientes con SIDA pueden tener títulos muy altos en el test EIA. La serie de diluciones recomendadas en el procedimiento puede no ser adecuada para calcular un título de anticuerpos EIA en este tipo de pacientes. Diluciones 1:5 adicionales pueden hacerse a medida que éstas se requieran.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El test Premier Cryptococcus Antigen está indicado para ser usado en muestras de suero o de LCR. No se recomienda usar este test para muestras diferentes a éstas. Un resultado negativo en el test no elimina el diagnóstico de una criptococosis, en particular, si tan sólo se ha recolectado una muestra de suero, y además, el paciente presenta síntomas compatibles con la enfermedad.

Un resultado positivo implica la presencia de antígeno de cryptococcus; sin embargo, todos los resultados del test deben ser revisados por el médico, teniendo en cuenta toda la información clínica del paciente.

Trichosporon beigeli produjo un resultado positivo falso en un caso aislado con una prueba de látex⁹ y una reacción cruzada similar es posible con el test EIA.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO

El test Premier Cryptococcal Antigen fue evaluado en dos laboratorios clínicos grandes de los EE. UU. (279 muestras) y en Meridian Bioscience, Inc., (88 muestras, incluyendo una muestra indeterminada que no pudo repetirse por no haber cantidad suficiente, y por lo tanto, no está anotada abajo). El Sistema de Aglutinación de Látex CALAS® fue utilizado como prueba de referencia. Los resultados obtenidos en ambas pruebas están resumidos en la tabla que se presenta a continuación:

		Látex	
		+	-
Premier	+	108	6*
EIA	-	0	252

Sensibilidad	100%
Especificidad	98%
Concordancia	98%

*En cuatro de seis discrepancias anotadas anteriormente, las muestras anteriores, o las siguientes, confirmaron que el paciente padecía de criptococosis.

El test EIA aparentaba ser más sensible al detectar concentraciones bajas de antígeno de cryptococcus durante las etapas tempranas o tardías de la enfermedad. Los límites de detección para los serotipos A y B que han sido demostrados equivalen a 0,63 ng/mL para el test EIA, y 7,6 ng/mL para el ensayo de aglutinación.¹⁰

Los pacientes con SIDA se han destacado como un grupo susceptible a la criptococosis; y la criptococosis constituye la cuarta infección en orden de ocurrencia relacionada con las complicaciones del SIDA.² Los resultados de una comparación entre el diagnóstico clínico y el Test Premier Cryptococcal Antigen en una población de pacientes con SIDA son mostrados a continuación.

		Latex	
		+	-
Premier	+	44	2
EIA	-	0	25

ESPECIFICIDAD DE LA PRUEBA

La siguiente lista corresponde a organismos que dieron resultado negativo al ser analizados en la prueba EIA:

Microorganismos estudiados para determinación de Reacción Cruzada			
Bacterias	Preparaciones antigénicas a base de Hongos	Virus	Levaduras
<i>Escherichia coli</i> K1	<i>Aspergillus flavis</i>	Coxsackie A-16, B-5	<i>Candida albicans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Echovirus II	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> 301,362	<i>Aspergillus niger</i>	Poliiovirus I, II, III	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Coccidioides immitis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan strain 1	<i>Histoplasma capsulatum</i>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
<i>Streptococcus agalactiae</i>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			

El único microorganismo que daba reacciones de reactividad cruzada en el test EIA fue *T. Beigelii*. Este organismo no se encuentra por lo regular en muestras típicas que se están analizando para la presencia del antígeno de cryptococcus.⁹

PRECISIÓN DEL TEST

Variabilidad dentro de la misma prueba – 16 réplicas de 3 sueros con resultado positivo fueron analizadas en un ensayo para determinar la reproducibilidad dentro de la misma prueba.

Muestra	Absorbancia Media	CV %
1	0,67	2,1
2	1,74	2,2
3	2,70	3,0

Los coeficientes de variación para las tres mismas muestras corridas en 16 replicados y utilizando el procedimiento para detectar la presencia del antígeno de cryptococcus. (añadiendo los reactivos directamente de los viales con goteros) fueron 12, 3,5 y 3,0% respectivamente.

Variabilidad entre prueba y prueba – 16 réplicas de 3 sueros con resultado positivo fueron analizadas en varios ensayos y por más de un operador.

Muestra	Absorbancia Media	CV %
4	0,27	11,8
5	0,73	11,5
6	1,76	7,2

Los coeficientes de variación para las tres mismas muestras, utilizando el procedimiento para determinar la presencia de antígeno (añadiendo los reactivos directamente de los viales con goteros) en 16 replicados de cada muestra fueron de 30, 5,8 y 18,9% respectivamente.

DEUTSCH

PREMIER™ CRYPTOCOCCAL ANTIGEN

REF Bestellnummer 602096

IVD In-Vitro-Diagnostikum

Enzymimmunoassay zum Nachweis von Kryptokokken-Antigen in Serum und Liquor

VERWENDUNGSZWECK

Der Premier Cryptococcal Antigen enzymimmunoassay (EIA) wird als Screening- oder semi-quantitatives Testsystem zum Nachweis von Polysaccharid-Antigenen der Kapsel von *Cryptococcus neoformans* in Serum und Liquor eingesetzt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Die Kryptokokkose tritt charakteristischerweise zunächst als subklinische pulmonale oder Lungen Infektion auf, die durch den verkapselten hefeartigen Pilz *C. neoformans*¹ verursacht wird. *C. neoformans* kann zwar jedes Organ infizieren, die schwersten Komplikationen treten jedoch auf, wenn der Organismus das zentrale Nervensystem von Patienten mit geschwächtem Immunsystem befallt.¹⁻³ Das Polysaccharid-Antigen der Kapsel enthält vier Haupt-Serotypen (A-D), wobei 80-85% der Isolate entweder vom Typ A oder B sind.⁴

Der Nachweis des Kryptokokken-Antigens im Serum oder Liquor wird erfolgreich für die Diagnose der Meningitis, die mit der *C. neoformans*-Infektion einhergeht, eingesetzt.^{1,2,3,7,8} Wenn sowohl Serum als auch Liquor analysiert werden, liegt die Sensitivität für den Antigen-Nachweis über 90%.^{1,2,8} Der Antigen-Nachweis ist empfindlicher als das Präparat mit India-Tinte^{5,8} und ist eine wertvolle Hilfe in der Diagnostik, wenn die Kultur negativ ist.⁸

Die Ermittlung relativer Veränderungen von Antigenpiegeln ist von prognostischem Wert und wird zur Überwachung der Wirksamkeit der medikamentösen Therapie eingesetzt.^{1,2,5,6}

Der Premier Cryptococcal Antigen EIA weist alle Serotypen des Kryptokokken-Antigens einer Probe nach und liefert verlässliche semi-quantitative Ergebnisse.

TESTPRINZIP

Der Premier Cryptococcal Antigen EIA verwendet polyklonale Antikörper gegen Kryptokokken, die an die Vertiefungen von Mikrotiterplatten gebunden sind, sowie ein Nachweissystem, das auf ein Monoklonal-Peroxidasekonjugat basiert. Wenn Kryptokokken-Antigene in der Proben vorhanden sind, bildet sich zwischen den Antigenen, dem Enzymkonjugat und den gebundenen Antikörpern ein Komplex. Nachdem durch Waschen ungebundene Konjugate abgetrennt wurden, ist die Substratlösung zuzufügen. In der Gegenwart von gebundenem Enzym entwickelt sich ein farbiges Reaktionsprodukt. Die Farbintensität korreliert mit der Menge an vorhandenem Kryptokokken-Antigen.

REAGENZII/M LIEFERUMFANG ENTHALTENE ARTIKEL

- Premier Enzym-Konjugat:** Für Kryptokokken-Antigen spezifische monoklonale Antikörper, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, in gepufferter Proteinlösung mit Thimerosal (0,02 %) als Konservierungsmittel.
- Waschpuffer (Premier 20X Wash Buffer II):** 20fach konzentriert, mit Thimerosal (0,2 %) als Konservierungsmittel.
- Substrat (Premier Substrate II):** Gepufferte Lösung mit Harnstoffperoxid und Tetramethylbenzidin.
- Stopplösung (Premier Stop Solution II):** 2N Schwefelsäure. **VORSICHT:** Hautkontakt vermeiden, bei Kontakt mit Wasser spülen.
- Premier Positiv-Kontrolle:** Kryptokokken-Antigen in gepufferter Proteinlösung mit Gentamycin (0,16 %) und Thimerosal (0,01 %) als Konservierungsmittel.
- Premier Probenverdünnungspuffer:** Gepufferte Proteinlösung mit Thimerosal (0,02 %) als Konservierungsmittel.
- Premier Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatten:** Mikrotiterstreifen aus Plastik zum Auseinanderbrechen, beschichtet mit polyklonalen Antikörpern gegen Kryptokokken.
- Halter für Mikrotiter-Streifen.** Die maximale Anzahl der mit diesem Kit durchführbaren Tests ist auf der äußeren Schachtel angegeben.

NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTENE ARTIKEL

- Pipetten zum Pipettieren von 50 µL, 100 µL und 200 µL
- Reagenzröhrchen (12 x 75 mm) zur Probenverdünnung
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- EIA-Plattenphotometer für Extinktionsmessungen bei 450 nm oder 450/630 nm
- Spritzflasche oder automatisches EIA-Plattenwaschgerät

- Stopp-Uhr
- Messzylinder zur Herstellung des Arbeits-Waschpuffers (einfach konzentriert)

VORSICHTSHINWEISE

- Alle Reagenzien dürfen nur für die *in vitro* Diagnostik eingesetzt werden.
- Patientenproben können infektiöse Erreger enthalten und sollten als potentiell pathogen gehandhabt und entsorgt werden. Bei der Handhabung von Patientenproben und bei der Testdurchführung Einmalhandschuhe tragen.
- Alle Reagenzien sollten vor dem Gebrauch vorsichtig durchgemischt und auf Raumtemperatur gebracht werden.
- Die Reagenzien von Test-Kits unterschiedlicher Chargennummern sollten nicht ausgetauscht werden. Abgelaufene Reagenzien nicht verwenden.
- Die Reagenzienflaschen senkrecht halten um eine sorgfältige Zugabe von Tropfen der richtigen Größe zu erzielen.
- Die Fläschchen mit den richtigen Deckeln wiederverschließen.
- Die Positivkontrolle enthält inaktiviertes Kryptokokken-Antigen. Dieses Reagenz, benutzter Waschpuffer, benutzte Mikrotiterplatten etc. Sollten als potentiell infektiöses Material entsorgt werden. Die Mikrotiterplatten-Halter sollten desinfiziert und für weitere Tests aufbewahrt werden.
- Hautkontakt mit der Stopplösung (2N Schwefelsäure) sollte vermieden werden. Bei Kontakt sofort mit Wasser spülen.
- Unbenutzte Vertiefungen müssen in den wiederverschließbaren Beutel zurückgelegt und sofort verschlossen werden. Es ist wichtig, die Streifen vor Feuchtigkeit zu schützen.**
- Ein Verspritzen der verdünnten Proben beim Einfüllen in die Vertiefung wird vermieden, wenn die Pipettenspitze halb in die Vertiefung eingebracht wird und die Probe langsam an der Seite der Vertiefung nach unten abfließt.
- Das Auswaschen der Kavitäten sollte nach der Testanleitung durchgeführt werden. **Unzureichendes Waschen kann erhöhte Hintergrund-Extinktionen verursachen.**
- Inkubationszeiten und Reagenzienkonzentrationen wurden im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität optimiert. Jede Abweichung von den vorgegebenen Inkubationszeiten ist zu vermeiden.
- Proben nicht in einem automatisch abtauenden Gefriergerät lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Probe kann die Testergebnisse beeinflussen.

R- UND S-SÄTZE (GEFAHREN – UND SICHERHEITANGABEN)

Schwefelsäure

Stopplösung (Premier Stop Solution II) - Xi Reizend

R-SÄTZE

R:36/38 Reizt die Augen und die Haut

Methanol

Substrat (Premier Substrate II) - F – Leichtentzündlich, T – Giftig

R-SÄTZE

R:11 Leichtentzündlich
R:66 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R:20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R:39/23/24/25 Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken

S-SÄTZE

S:45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S:36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S:37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen

Thimerosal

Waschpuffer (Premier 20X Wash Buffer II) - Xn Gesundheitsschädlich

R-SÄTZE

R:33 Gefahr kumulativer Wirkungen
R:20/21/22 Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut

S-SÄTZE

S:36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S:37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Haltbarkeitsdatum wird auf dem Etikett des Test-Kits angegeben. Der Test-Kit sollte bei 2-8 C gelagert werden und nach jedem Gebrauch sofort wieder in den Kühlschrank gelegt werden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIIEN

- Den gesamten Testkit einschließlich dem Beutel mit den Mikrotiterplatten vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
- Ausreichende Mengen Arbeits-Waschpuffer (1fach konzentriert) vorbereiten, indem 1 Teil 20fach konzentrierter Waschpuffer mit 19 Teilen destilliertem Wasser verdünnt wird. Der Arbeits-Waschpuffer kann bei Raumtemperatur bis zu 1 Monat lang aufbewahrt werden.

VORBEREITUNG DER PROBEN

- Liquor:
 - Proben aseptisch nach anerkannten Methoden gewinnen (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 2**)
 - 15 Minuten bei 1000 xg zentrifugieren, um alle weißen Blutkörperchen und Partikel zu entfernen.
 - Liquor vorsichtig in einen sterilen Behälter überführen und verschließen.

- d. Proben können entweder sofort getestet, 3 Tage lang bei 2-8 C gelagert oder durch Einfrieren konserviert werden. Nicht in einem automatisch abtauernden Gefriergerät lagern.

2. Serum

- a. Vollblut aseptisch wie hausintern üblich abnehmen (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 2**). Die Probe soll keine Antikoagulantien enthalten sonst kann der Test ungültig sein.
- b. Blut 10 Minuten oder länger bei Raumtemperatur im Abnahmegefäß gerinnen lassen.
- c. Bei 1000 xg 10 Minuten zentrifugieren.
- d. Serum vorsichtig in einen sterilen Behälter überführen und verschließen.
- e. Proben können entweder sofort getestet, 3 Tage lang bei 2-8 C gelagert oder durch Einfrieren konserviert werden. Nicht in einem automatisch abtauernden Gefriergerät lagern.

Achtung: Eine Vorbehandlung der Proben wird für den Premier Cryptococcal Antigen EIA nicht empfohlen. Studien zeigen, dass eine Behandlung mit Pronase oder eine Hitzebehandlung der Proben (56 C, 15 Minuten) die Screening-Testergebnisse offensichtlich nicht negativ beeinflussen. Gelegentlich verändert eine Pronase- oder Hitzebehandlung die EIA-Titer. Daher ist es bei einer Behandlung mit Pronase unerlässlich, Pronase für **alle** Proben eines einzelnen Patienten zu verwenden, wenn die Ergebnisse zur Überwachung der Therapie verwendet werden.

Proben, die später als Vergleichsproben herangezogen werden sollen, sollten aliquotiert und eingefroren werden, da eine Lagerung von mehr als 72 Stunden bei 2-8 C die Titer verändern kann.

DURCHFÜHRUNG EINES SCREENING-TESTS

Dieser Test sollte nur von qualifiziertem Personal unter Berücksichtigung der jeweiligen regulatorischen Bestimmungen durchgeführt werden.

Ein Screening-Test kann direkt mit – wie oben beschrieben vorbereitetem – Serum oder Liquor durchgeführt werden. Der Screening-Test dient lediglich zur Differenzierung zwischen positiven und negativen Proben. Die Werte, die im Screening-Test erhoben werden können nicht für die Berechnung von EIA-Titern herangezogen werden. Zur exakten Bestimmung sollte ein semiquantitativer Test durchgeführt werden.

1. Die für Proben und zwei Kontrollen benötigte Anzahl von Mikrotiter-Vertiefungen abbrechen. Vertiefungen in den Halter einsetzen und die Plätze aller Vertiefungen notieren (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 9**).
2. 50 µL von jeder Probe, 50 µL von dem Probenverdünnungspuffer (Negativkontrolle) und 1 Tropfen Positivkontrolle auf den Boden jeweils einer Vertiefung geben. Durch leichtes Schütteln durchmischen. **Darauf achten, dass die Proben nicht kreuzkontaminiert werden, da dies zu falschen Ergebnissen führen kann.**
3. Bei Raumtemperatur (20-30 C) 10 Minuten inkubieren.
4. Die Proben aus den Vertiefungen durch Absaugen oder durch Umdrehen der Platte und Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Jede Vertiefung mit Arbeits-Waschpuffer (ca. 300 µL) füllen. Die Platte umdrehen und auf einer saugfähigen Unterlage ausklopfen. Diesen Waschvorgang dreimal wiederholen für insgesamt 4 Waschschrte (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 11**).
5. 1 Tropfen Enzym in jede Vertiefung geben. Durch leichtes Schütteln vermischen. Bei Raumtemperatur (20-30 C) 10 Minuten inkubieren.
6. Die Lösung aus den Vertiefungen durch Absaugen oder durch Umdrehen der Platte und Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Jede Vertiefung mit Arbeits-Waschpuffer (ca. 300 µL) füllen. Die Platte umdrehen und auf einer saugfähigen Unterlage ausklopfen. Diesen Waschvorgang dreimal wiederholen für insgesamt 4 Waschschrte (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 11**).
7. 2 Tropfen Substratlösung in jede Vertiefung geben. Durch leichtes Schütteln 15-20 Sekunden mischen.
8. Bei Raumtemperatur (20-30 C) 10 Minuten inkubieren.
9. 2 Tropfen Stopplösung in jede Vertiefung geben. Durch leichtes Schütteln durchmischen und 2 Minuten vor dem Ablesen warten.
10. Reaktionen ablesen:
 - a. Ablesen mit bloßem Auge: innerhalb von 15 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung ablesen.
 - b. Ablesen mit dem Photometer: das EIA-Plattenphotometer gegen Luft abgleichen. Die Unterseite der Vertiefungen mit einem fusselfreien Tuch abwischen. Die Extinktion bei 450 nm oder 450/630 nm innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung ablesen.
11. Den Halter für die Mikrotiterstreifen desinfizieren und aufbewahren. Alles andere benutzte Material als potentiell pathogenen Abfall entsorgen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Testkit-Bestandteile sollten vor jedem Gebrauch auf sichtbare Zeichen von mikrobiellem Befall, Vereisungen oder Undichtigkeiten untersucht werden.

In jedem Testlauf müssen Positiv- und Negativ-Kontrolle mitlaufen, um die Qualität der Reagenzien zu überprüfen.

Der Extinktionswert der Negativ-kontrolle (Probenverdünnungspuffer) sollte bei 450 nm > 0,000 und < 0,100 oder bei 450/630 nm > 0,000 und < 0,070 sein. Der Extinktionswert der Positiv-Kontrolle sollte sowohl bei 450 nm als auch bei 450/630 nm > 0,700 sein.

Wenn die Absorptionswerte nicht mit den mit bloßem Auge erkennbaren Ergebnissen übereinstimmen, sollte die Unterseite der Vertiefung abgewischt, die Ausrichtung der Vertiefungen im Plattenhalter sowie die Ausrichtung des Plattenhalters überprüft werden und nochmals gemessen werden.

Die Ergebnisse jeder Qualitätskontrolle sollten in einem geeigneten Laborjournal festgehalten werden, so dass die Testdurchführung leichter überwacht werden kann und behördliche Vorschriften eingehalten werden können.

Wenn die erwarteten Werte nicht abgelesen werden, bitte den Technischen Service von Meridian verständigen.

INTERPRETATION DES SCREENING TESTS

1. Ablesen mit bloßem Auge
 Negativ = farblos
 Positiv = deutlich gelbe Farbe
 Eine schwache Gelbfärbung muss spektrophotometrisch ausgewertet werden.
2. Spektrophotometrische Messung bei einfacher Wellenlänge (450 nm)
 Negativ = $OD_{450} < 0,100$
 Unbestimmt = $OD_{450} \geq 0,100$ und $< 0,150$
 Positiv = $OD_{450} \geq 0,150$
3. Spektrophotometrische Messung bei doppelter Wellenlänge (450/630 nm)
 Negativ = $OD_{450/630} < 0,070$
 Unbestimmt = $OD_{450/630} \geq 0,070$ und $< 0,100$
 Positiv = $OD_{450/630} \geq 0,100$

Unbestimmte Ergebnisse müssen wiederholt werden. Wenn die wiederholten Ergebnisse immer noch unbestimmt sind, sollte eine zweite Probe genommen und getestet werden.

Extrem starke Reaktionen können innerhalb weniger Minuten nach Zugabe der Stopplösung zu einem purpurfarbenen Niederschlag führen; diese Reaktion sollte als positiv eingestuft werden.

DURCHFÜHRUNG EINES SEMI-QUANTITATIVEN TESTS

Dieser Test sollte nur von qualifiziertem Personal unter Berücksichtigung der jeweiligen regulatorischen Bestimmungen durchgeführt werden.

Bei jeder positiven Liquor- oder Serum-Probe kann ein semi-quantitativer Test durchgeführt werden. Dadurch werden Werte erzielt, die für die Berechnung exakter EIA-Titer benötigt werden.

Wenn eine medikamentöse Therapie durch die Analyse aufeinanderfolgender Proben überwacht werden soll, werden bei der Titerbestimmung einer jeden neuen Probe am besten alle vorherigen Proben mitanalysiert. Es ist nicht zu empfehlen, EIA Titer aus verschiedenen Testläufen direkt zu vergleichen, um die Therapie zu überwachen. Zur Vermeidung von wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Proben sollten mehrere Aliquots von jeder Probe eingefroren werden.

A. Verdünnungen

Die folgende Verdünnungsreihe wird bei der Durchführung eines semi-quantitativen Tests empfohlen. 100 µL Probe und 100 µL Probenverdünnungspuffer in ein Reagenzröhrchen geben, das mit der Nr. 1 gekennzeichnet ist, und 1-3 Sekunden auf dem Vortex rütteln. Aus dieser Mischung eine Reihe von 5fach Verdünnungen wie folgt herstellen:

1. Jeweils 200 µL Probenverdünnungspuffer in 4 Reagenzröhrchen, die mit den Nummern 2-5 beschriftet sind, geben.
 2. Mit einer sauberen Pipette 50 µL der verdünnten Patientenprobe aus Röhrchen 1 in Röhrchen 2 geben und gut durchmischen.
 3. 50 µL aus Röhrchen 2 in Röhrchen 3 geben und gut durchmischen. Diese Verdünnungsschritte wiederholen bis zu Röhrchen 5. Weitere 1:5 Verdünnungen können hergestellt werden, wenn nötig.
- Die Verdünnungsstufen sind dann: 1:2 1:10 1:50 1:250 1:1250

B. Testdurchführung

Um eine möglichst hohe Präzision zu erzielen müssen alle Reagenzien mit einer Pipette abgemessen werden. Die Tropfflaschen sollten verwendet werden um die benötigte Tropfenzahl (siehe unten) in ein sauberes Reagenzröhrchen zu geben. Die benötigten Reagenzvolumente mit einer Pipette in die Vertiefungen geben.

ACHTUNG: Die Tropfspitzen von den Reagenzienflaschen nicht entfernen; Verunreinigungen können die Aktivität beeinträchtigen.

Anzahl der benötigten Tropfen

	Enzymkonjugat	Substrat	Stopplösung
1 Titer (7 Vertiefungen)	7	22	12
2 Titer (12 Vertiefungen)	11	35	19
3 Titer (17 Vertiefungen)	15	49	27
4 Titer (22 Vertiefungen)	19	62	30
10 Titer (52 Vertiefungen)	42	143	79

1. Die für die Proben und zwei Kontrollen benötigte Anzahl von Mikrotiter-Vertiefungen abbrechen. Vertiefungen in den Halter einsetzen und die Positionen aller Vertiefungen notieren (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 9**).
2. Jeweils 50 µL der verdünnten Probe, der Positivkontrolle und des Probenverdünnungspuffers (Negativkontrolle) auf den Boden einer Vertiefung geben. **Darauf achten, dass die Proben nicht kreuzkontaminiert werden, da dies zu falschen Ergebnissen führen kann.**
3. Bei Raumtemperatur (20-30 C) 10 Minuten inkubieren.
4. Die Proben aus den Vertiefungen durch Absaugen oder durch Umdrehen der Platte und Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Jede Vertiefung mit Arbeits-Waschpuffer (ca. 300 µL) füllen. Die Platte umdrehen und auf einer saugfähigen Unterlage ausklopfen. Diesen Waschvorgang dreimal wiederholen für insgesamt 4 Waschschrte (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 11**).
5. 50 µL Enzymkonjugat in jede Vertiefung einschließlich in den Vertiefungen der Kontrollen geben. Durch leichtes Schütteln vermischen. Bei Raumtemperatur (20-30 C) 10 Minuten inkubieren.

6. Die Lösung aus den Vertiefungen durch Absaugen oder durch Umdrehen der Platte und Ausklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernen. Jede Vertiefung mit Arbeits-Waschpuffer (ca. 300 µL) füllen. Die Platte umdrehen und auf einer saugfähigen Unterlage ausklopfen. Diesen Waschvorgang dreimal wiederholen für insgesamt 4 Waschschriffe (**siehe VORSICHTSMASSNAHMEN Punkt 11**).
7. 100 µL Substratlösung in jede Vertiefung geben. Durch leichtes Schütteln 15-30 Sekunden mischen.
8. Bei Raumtemperatur (20-30 C) 10 Minuten inkubieren.
9. 100 µL Stopplösung in jede Vertiefung geben. Durch leichtes Schütteln durchmischen und 2 Minuten vor dem Ablesen warten.
10. Photometrische Auswertung: das EIA-Plattenphotometer gegen Luft abgleichen. Die Unterseite der Vertiefungen mit einem fusselfreien Tuch abwischen. Die Extinktion bei 450 nm oder 450/630 nm innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung ablesen.
11. Den Halter für die Mikrotiterstreifen desinfizieren und aufbewahren. Alles andere benutzte Material als potentiell pathogenen Abfall entsorgen.

INTERPRETATION DES SEMI-QUANTITATIVEN TESTS

ACHTUNG: Das Vorgehen zur Qualitätskontrolle, wie für den Screening-Test beschrieben, sollte für den semi-quantitativen Test beibehalten werden.

Bei der Benutzung eines Photometers mit einfacher Wellenlänge, muss die Extinktion der Negativkontrolle (Probenverdünnungspuffer) vor der Berechnung der EIA-Titer von allen anderen Extinktionswerten abgezogen werden.

Werte, die bei zweifacher Wellenlänge gemessen wurden, müssen nicht korrigiert werden.

A. Auswahl von Extinktionswerten für die Berechnungen

1. Nur Extinktionswerte aus dem semi-quantitativen Test zur Berechnung der EIA-Titer heranziehen.
2. Den höchsten Extinktionswert innerhalb des annehmbaren Bereichs zwischen 0,100 und 1,500 zur Berechnung der EIA-Titer auswählen. Wenn die nächsthöhere Verdünnung ebenfalls eine Extinktion innerhalb des annehmbaren Bereichs aufweist, sollte dieser Wert ebenfalls ausgewählt werden.
3. Wenn die 1:2 Verdünnung der Probe eine Extinktion < 0,100 aufweist, sollte der Test mit der unverdünnten Probe wiederholt werden.
4. Den EIA-Titer aus der ausgewählten Extinktion wie unter B beschrieben berechnen. Wenn zwei Extinktionswerte ausgewählt wurden, sollte jeder Titer für sich berechnet werden und der Durchschnitt aus den Ergebnissen gebildet werden.

ACHTUNG: Die Bildung eines purpurfarbenen Niederschlags macht ein positives Ergebnis nicht ungültig, aber die abgelesenen Werte dieser Vertiefungen können nicht für die Berechnung des EIA-Titers herangezogen werden.

B. Berechnung

1. Den EIA-Titer für eine bestimmte Probe nach der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Extinktionswert} \times \text{Multiplikationsfaktor} = \text{EIA-Titer}$$

Nr. Des Reagenzröhrchens/bzw. Der Vertiefung Verdünnung	Multiplikationsfaktoren*				
	1	2	3	4	5
Verdünnung	1:2	1:10	1:50	1:250	1:1250
Multiplikationsfaktor	20	100	500	2,500	12,500

* für die Berechnung des EIA-Titers unverdünnter Proben einen Multiplikationsfaktor von 10 verwenden

2. Probenberechnungen:

Wenn eine Patientenprobe zum Beispiel eine Extinktion von 1,2 bei einer Verdünnung von 1:50 hatte, liegt der EIA-Titer bei: $1,2 \times 500 = 600$, dies wird mit 1:600 angegeben.

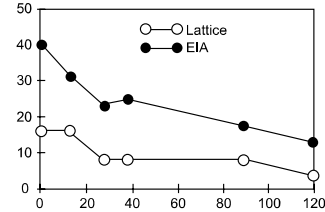
C. Weitergabe von EIA-Titern

Die Ergebnisse der EIA-Berechnungen können an die Ärzte als EIA-Titer weitergegeben werden. Ein hoher Titer gibt eine hohe Antigen-Konzentration an. Allerdings sollten die EIA-Titer nicht mit Latex-Titern verglichen werden. Aufgrund von Serotyp-Variationen und unterschiedlicher Testtechnologie, sind EIA-Titer numerisch nicht gleichwertig mit Latex-Titern. Ein Abfall des Titers, um weniger als das Vierfache ist nicht als klinisch signifikant⁶ einzustufen.

ERWARTUNGSWERTE

Kryptokokken-Antigen in Liquor oder Serum von nicht behandelten Patienten zeigt eine aktive Infektion an.¹⁻³ Der Premier Cryptococcal Antigen EIA ist sowohl von diagnostischem als auch von prognostischem Werte, da die Antigen-Konzentrationen bei fortschreitender Erkrankung ansteigen und im Verlauf einer erfolgreichen Therapie abfallen.^{1,2,5,6} Wenn die Titer nicht abfallen, ist dies ein Hinweis auf eine inadäquate Therapie. Bei einigen behandelten Patienten können die Antigen-Spiegel jedoch über längere Zeiträume unverändert bleiben, obwohl keine lebenden Organismen nachweisbar sind.⁸

Vergleich von EIA und Latex-Titern bei einem einzelnen Patienten



Der primäre Nutzen für die semi-quantitative Bestimmung mit dem Latex-Test oder dem EIA besteht darin, den Verlauf der Krankheit und die Behandlung bei jedem Patienten individuell festlegen zu können. Die Daten zeigen, daß der Premier Cryptococcal Antigen EIA eine wertvolle Hilfe für das Monitoring von Therapien ist.

AIDS Patienten haben unter Umständen einen sehr hohen EIA-Titer. Die Verdünnungsreihen, die im Arbeitsablauf empfohlen werden, sind eventuell für die Kalkulation des EIA Titers nicht ausreichend. Weitere 1:5 Verdünnungen können bei Bedarf durchgeführt werden.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Der Premier Cryptococcal Antigen EIA ist für die Anwendung bei Liquor- und Serumproben ausgelegt. Für andere Proben ist der Einsatz nicht zu empfehlen.

Ein negatives Ergebnis schließt nicht die Diagnose einer Kryptokokkose aus, insbesondere dann, wenn nur eine einzelne Probe analysiert wurde und der Patient weiterhin Symptome, die für Kryptokokkose typisch sind, zeigt.

Ein positives Ergebnis deutet auf das Vorkommen von Kryptokokken-Antigen hin; dennoch sollte der Arzt alle Testergebnisse im Licht anderer klinischer Daten beurteilen.

In einem Fall bedingte *Trichosporon beigelii* ein falsch positives Ergebnis im Latextest, eine ähnliche Kreuzreaktion ist im EIA möglich.⁹

SPEZIFISCHE LEISTUNGSMERKMALE

Der Premier Cryptococcal Antigen EIA wurde in zwei der bedeutendsten klinischen Labors der USA (279 Proben) und bei Meridian Bioscience, Inc. (88 Proben einschließlich eine Probe mit unklarem Ergebnis: bei unzureichender Probenmenge konnte die Probe mit unklarem Ergebnis nicht weiter analysiert werden, diese Probe ist unten nicht aufgeführt) bewertet. Das CALAS® Latex Agglutination-System wurde als Referenztest herangezogen. Die Ergebnisse beider Tests sind unten in der Tabelle zusammengefasst:

		Latex	
		+	-
Premier	+	108	6*
EIA	-	0	252
Sensitivität		100%	
Spezifität		98%	
Übereinstimmung		98%	

* Bei vier der sechs Proben, die abweichende Ergebnisse zeigten, bestätigten vorangegangene oder nachfolgende Proben, dass die Patienten an einer Cryptokokkose litten.

Der EIA schien empfindlicher beim Nachweis niedriger Konzentrationen von Kryptokokken-Antigen in den frühen oder späten Stadien der Erkrankung zu sein. Die Nachweisgrenzen für die Serotypen A und B liegen bei 0,63 ng/mL mit dem EIA und bei 7,6 ng/mL mit dem Latex-Test.¹⁰

Patienten mit AIDS sind inzwischen die Patientengruppe, die am meisten für Cryptokokkose anfällig ist. Die Cryptokokkose ist die vierthäufigste Infektionserkrankung, die als Komplikation bei AIDS auftritt.² Ein Vergleich der klinischen Diagnose und den Ergebnissen des Premier Cryptococcal Antigen EIA bei einer AIDS-Population ist unten aufgeführt:

Klinische Diagnose Cryptokokkose

		+		-	
		+	-	+	-
Premier	+	44	2		
EIA	-	0	25		

SPEZIFITÄT

Die folgende Liste zeigt die Organismen, die beim Test mit dem EIA negative Ergebnisse zeigten:

Mikroorganismen, die auf Kreuzreaktivität getestet wurden

Bakterien	Pilze	Viren	Hefen
<i>Escherichia coli</i> K1	<i>Aspergillus flavus</i>	Coxsackie A-16, B-5	<i>Candida albicans</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Echovirus II	<i>Rhodotorula rubra</i>
<i>Neisseria meningitidis</i> 301,362	<i>Aspergillus niger</i>	Poliovirus I, II, III	<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Coccidioides immitis</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan strain 1	<i>Histoplasma capsulatum</i>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
<i>Streptococcus agalactiae</i>			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			

Der einzige Organismus, der im EIA eine Kreuzreaktion zeigte, war *T. Beigelii*. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass dieser Organismus in den typischen Proben gefunden wird, die auf Cryptokokken-Antigen getestet werden.⁹

TESTPRÄZISION

Variabilität innerhalb eines Testlaufs (Intra-assay variability) – Je 16 Aliquots von 3 bekannten positiven Seren wurden in einem Testlauf analysiert, um die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Testlaufs zu bestimmen.

Probe	Mittlere Extinktion	% VI
1	0,67	2,1
2	1,74	2,2
3	2,70	3,0

Die Variationskoeffizienten derselben 3 Proben (jeweils 16 Aliquots) lagen im Screening-Test mit Tropfspitzen bei 12%, 3,5% bzw. 3,0%.

Variabilität zwischen den Testläufen (Inter-assay variability) – Je 16 Aliquots von 3 bekannten positiven Seren wurden in mehreren Testläufen von mehr als einer Person analysiert.

Probe	Mittlere Extinktion	% VI
4	0,27	11,8
5	0,73	11,5
6	1,76	7,2

Die Variationskoeffizienten derselben 3 Proben (jeweils 16 Aliquots) lagen im Screening-Test mit Tropfspitzen bei 30%, 5,8% bzw. 18,9%.

BIBLIOGRAPHY

- Perfect, J.R. 1989. Cryptococcosis. Infectious Disease Clinics of North America. 3:77-102.
- Patterson, T.F. and V.T. Andriole. 1989. Current Concepts in Cryptococcosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8:457-465.
- Rinaldi, M.G. 1982. Cryptococcosis. Lab. Medicine 13:11-19.
- Murphy, J.M. 1989. Cryptococcosis, in *Immunology of the Fungal Diseases*. Chapter 4, pp. 98-138. CRC Press., Boca Raton, FL.
- Bennett, J.E., H.F. Hasenclever and B.S. Tynes. 1964. Detection of cryptococcal polysaccharide in serum and spinal fluid: value in diagnosis and prognosis. Trans. Assoc. Am. Physicians 77:145-150.
- Diamond, D. and E. Bennett. 1974. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. Ann. Int. med. 80:176-181.
- Goodman, J.S., L. Kaufman and M.G. Koening. 1971. Diagnosis of Cryptococcal meningitis: Value of immunologic detection of cryptococcal antigen. New Eng. J. of Med. 285:434-436.
- Kaufman, L. and S. Blumer. 1977. Cryptococcosis: The Awakening Giant. Proc. of the Fourth International Conference on the Mycoses. Pan American Health Organization Scientific Publication #356. pp. 176-182.
- McManus, E.J. and J.M. Jones. 1985. Detection of a *Trichosporon beigelii* antigen cross-reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in serum from a patient with disseminated *Trichosporon* infection. J. Clin. Microbiol. 21:681-685.
- Data on file (presented at ICAAC, October 1990, reprints available. Manuscript to be submitted to *Journal of Clinical Microbiology*, 1991).



SN11125

Rev. 12/07

Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: (513) 271-3700
Orders/Customer Service:
(800) 343-1980
Technical Support Center:
(800) 343-3858
Information Fax:(513) 272-5432
Ordering Fax:(513) 271-0124

EC REP

Meridian Bioscience Europe
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese (MI)
Italy
Authorized Representative
Tel.: +39 0331 433636
Fax: +39 0331 433616
e-mail: info@mdeur.com

Meridian Bioscience Europe France
Le Quadra
455, Promenade des Anglais
06299 Nice Cedex-3
France
Tel.: +33 (0) 49 3187210
Fax: +33 (0) 49 3187211
e-mail: info@meridianbioscience.fr

Meridian Bioscience Europe s.a. / n.v.
Rue de l'Industrie 7
1400 Nivelles
Belgium
Tel.: +32 (0) 67 89 59 59
Fax: +32 (0) 67 89 59 58
e-mail: info@mdeur.be

Meridian Bioscience Europe b.v.
Halderheiweg 6
5282 SN Boxtel
The Netherlands
Tel.: +31 (411) 621166
Fax: +31 (411) 624841
e-mail: meridian.info@planet.nl

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:
Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Codigo de lote / Chargenbezeichnung	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solución d'arrêt / Solution de parada / Stoplösung
	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugue enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
		CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
		CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
	Catalogue number / Numero de catalogo / Référence du catalogue / Número de catalogo / Bestellnummer	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campioni / Diluente echantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Mandatario nella Comunità Europea / Mandatario dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Contains sufficient for n tests / Contenuto sufficiente per n assg / Contenu suffisant pour n tests / Contenido suficiente para n ensayos / Inhalt ausreichend für n Prüfungen		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	REAG	Reagent / Reagent / Réactifs / Reactivos / Reagenzien

For technical assistance, call Technical Support Services at (800) 343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at (800) 543-1980.