

# Fungal Immunodiffusion Reagents

**REF** 100201, 100401, 100405,  
100601, 100801, 101009,  
101012, 103001, 103101

**IVD**

Rx Only

**INTENDED USE**  
The Meridian Bioscience Immunodiffusion Reagents are standardized, purified preparations for the in vitro determination of precipitating antibodies to two systemic fungal pathogens: *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) and *Coccidioides immitis* (*C. immitis*). Reagents are available for detection of either *Coccidioides immitis* "TP" (early) or "F" (late) antibodies. These reagents are optimized for use in the Ouchterlony double diffusion method.

**SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST**  
*H. capsulatum* and *C. immitis* are causative agents of deep-seated mycoses. These fungi present a diagnostic challenge to the microbiology laboratory and the physician.

Radiographically, lesions produced by the systemic fungi may be difficult to distinguish from each other, tuberculous lesions, neoplasms, (benign and malignant) cancerous tissue and each other. Symptoms are often unremarkable and can mimic various pneumonias, sarcoidosis, cancer and other maladies. Culturally and histologically the organisms can be difficult to demonstrate, even after repeated attempts.<sup>3-7</sup>

Frequently serology offers the only evidence available to guide treatment, suggest prognosis or lead to the selection of more definitive diagnostic techniques, such as intensive culture or biopsy. In addition, quantitative serology, such as complement fixation testing, can provide important information on the effects of chemotherapy.<sup>18</sup>

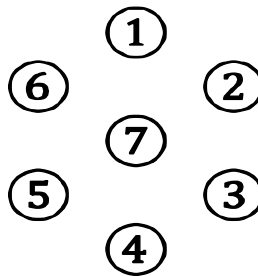
Fungal immunodiffusion tests are simple and reliable tools for the evaluation of suspected mycoses. Anticomplementary sera may be tested with these procedures. The tests also provide specificity data on reactions obtained by the complement fixation method. No expensive equipment is required and the procedures are simple enough to be performed by any laboratory, thus providing excellent screening methods.

**BIOLOGICAL PRINCIPLES**  
The Meridian Bioscience Fungal Immunodiffusion Reagents are based on the principle of double diffusion as described by Oudin and Ouchterlony. An antibody and its homologous soluble antigen are placed in separate wells cut in an agarose diffusion medium and allowed to diffuse outward. Between the two wells, a concentration gradient of each of the reaction components is established ranging from antigen excess closest to the antigen well, to antibody excess closest to the antibody well. A visible line of precipitate forms at the point of equivalence.<sup>10-12</sup>

The well patterns of the Meridian immunodiffusion plate are arranged to provide each patient test well with a reference known system so that identity reactions are readily apparent. (See figure 1)

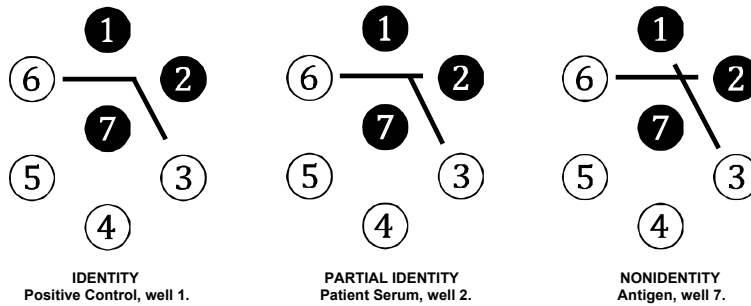
Antigens or antibodies may be tested for "identity" by placing a test well of the substance in question adjacent to the wells of a known system. If the antigen antibody complexes are identical, the precipitin lines form an unbroken line of identity with the known system. Partial and nonidentity reactions are also possible. (See figure 2)

Figure 1. Arrangement of sera and antigens in immunodiffusion well pattern.



Control positive serum, wells 1 & 4. Patient sera, wells 2, 3, 5 & 6. Antigen, well 7.

Figure 2. Identification of Immunodiffusion Bands



A partial identity reaction occurs when certain components of the antigens (or antibodies) are identical and others are not. The "spur" represents the components which are unrelated. A nonidentity reaction will occur when the antigen-antibody complexes are different. The resulting "X" or crossed reaction indicates that two unrelated complexes are present.

**REAGENTS/MATERIALS PROVIDED**

- Antigens:**
  - Histoplasmin: Catalog #100201, A purified mycelia cultural filtrate from the growth of *Histoplasma capsulatum* containing the "H" and "M" antigens in 1.0 mL size. The preparation contains 100 units/mL\* of each antigen. Lipids, media components, and most other antigenic components have been removed. (Note: The "H" band appears closest to the antibody well while the "M" band is closest to the antigen well.)
  - Coccidioidin "F": Catalog #100401 (1 mL) / Catalog #100405 (5 mL), Coccidioides "F" antigens are available in 1.0 mL and 5.0 mL sizes. The available antigens consist of cultural filtrates containing the "F" and "TP" antigens of *Coccidioides immitis* at a concentration of 100 units/mL.\*
  - Coccidioidin "TP": Catalog #103001, Coccidioides "TP" antigen consisting of purified cultural filtrates containing the "TP" antigen of *Coccidioides immitis* in a 1.0 mL size. The preparation contains 100 units/mL of antigen\* These antigens contain thimerosal at a final concentration of 1:10,000 as a preservative. Care should be exercised, however, to avoid microbial contamination.

\*These units are internal Meridian standards designed only to ensure lot to lot reproducibility of antigen concentration.

- Control Sera:** The following lyophilized control sera are provided in 1.0 mL size. Control sera contain either goat, rabbit or human serum with antibodies directed against their respective antigens. These control sera are preserved with 0.1% sodium azide. Care should be exercised to avoid microbial contamination.
  - Histoplasmosis Positive Control Catalog #100601: Contains specific antibodies directed against the "H" and "M" antigens of *H. capsulatum*. (Note: the "H" band appears near the antibody well, while the "M" band is closest to the antigen well.)
  - Coccidioidomycosis "F" Positive Control Catalog #100801: Contains specific antibodies directed against the "F" antigen of *C. immitis*.
  - Coccidioidomycosis "TP" Positive Control Catalog #103101: Contains specific antibodies directed against the "TP" antigen of *C. immitis*.

- Immunodiffusion Plates:** The immunodiffusion plates consist of 0.9% agarose in glycine/phosphate buffer at pH 7.4 + 0.2.
  - 1 Series Plates (12 plates/pack) Catalog #101012: Agarose gel plate with wells to test four patients per plate.
  - 4 Series Plates (9 plates/pack) Catalog #101009: Agarose gel plate with wells to test 16 patients per plate.

**Note:** 1 Series plates must be used for *C. immitis* "TP" testing. 1 Series or 4 Series Plates may be used for *C. immitis* "F" and *H. capsulatum* testing.

**Note:** Recent advances in plate formulation have eliminated the need for Immunodiffusion Band Intensifying Fluid.

**Note:** Due to the standardization necessary to the production of high quality Meridian Bioscience fungal serology reagents, performance of tests with antigens, control sera and plates with materials other than those produced by Meridian Bioscience, Inc. cannot be guaranteed. The user assumes full responsibility for any modification to the procedures published herein.


**MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED**


- Reagent quality water.
- Moist chamber; any convenient container such as a petri dish, plastic box or glass jar with a tight fitting cover containing moist filter paper or paper toweling is satisfactory provided the ID plates are stationary, level and remain hydrated during incubation.
- Reading light. Dark field plate readers are commercially available; however, a satisfactory system can be devised using a high intensity lamp in which the front of the bulb shield reflector is covered with black construction paper with a small hole (1-2 cm in diameter) cut for illumination. Alternatively, the plate may be held at a 45 degree angle to almost any bright indirect light source for adequate visualization.
- Pipette, capillary tube, or equivalent

- PRECAUTIONS**
- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
  - When handling blood specimens, adequate measures should be taken to prevent the dissemination of etiological agents potentially present in the specimen.
  - The control sera are preserved with sodium azide. Accumulation of this chemical in metal plumbing fixtures may represent an explosion hazard. It is therefore recommended that excess control serum simply be discarded in an appropriate waste receptacle or flushed down a drain with copious amounts of water.

**HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS**

There are no known hazards associated with this product: 100201, 100401, 100405, 103001.

REF 100601 & 100801 & 103101	<p><b>Signal Word:</b> Danger</p> <p><b>Hazardous Statements:</b> H300 – Fatal if swallowed H400 – Very toxic to aquatic life H410 – Very toxic to aquatic life with long lasting effects EUH032 – Contact with acids liberates very toxic gas <b>Precautionary Statement – EU (§28, 1272/2008)</b> P301 + P310 - IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician</p>
 Control Serum	

REF 101009 & 101012	<p><b>Signal Word:</b> Warning</p> <p><b>Hazardous Statements:</b> H302 - Harmful if swallowed</p>
 Immunodiffusion Plates	

**SHELF LIFE AND STORAGE**

Fungal antigens are best stored at refrigerated temperature (2-8 C). Repeated freezing and thawing is detrimental to these antigens. Extreme heat (more than 60 C) is also to be avoided. When stored at 2-8 C the antigens are stable until the expiration date indicated on each vial.

Positive control sera are stable in the lyophilized state until the stated expiration as indicated on each vial when stored at 2-8 C. Once reconstituted, the sera can be stored at 2-8 C for one month. If the sera will not be used within one month, it should be aliquoted and frozen at -20 C. At -20 C a minimum nine month life may be expected. Repeated freezing and thawing should be avoided. When the positive control sera are in use, the period at room temperature should be kept as short as possible.

Immunodiffusion plates should be stored unopened at 2-8 C until the stated expiration date on the package. If plate packages are opened and the plates must be stored before use, they must be kept in a tightly sealed, humid container to avoid drying. A resealable plastic container with a small moist sponge or towel is ideal.

**SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION**

- For optimal results, serum is aseptically obtained from the patient.
- If a delay is encountered in specimen processing, refrigeration for up to 72 hours is permissible. Specimens may be stored up to six months at -20 C with no loss of activity, provided they are not repeatedly thawed and refrozen. Specimens in transit between laboratories should be maintained at 2-8 C for optimal results. Specimens may be preserved with 1:10,000 thimerosal or 0.1% sodium azide if necessary.
- Greater sensitivity can be achieved when performing the Cocci "TP" antibody test by concentrating the patient's serum approximately 8:1.<sup>13-16</sup> This can be accomplished by pervaporation or use of a 125000 molecular weight cutoff membrane filter (e.g. Amicon™ B-125 or equivalent). While various strategies are available for pervaporation, the serum may be simply placed in a short length of dialysis tubing and air dried or gently warmed with a hand dryer until the correct volume reduction is obtained.
- In a limited clinical study, a 15% increase in sensitivity was obtained when specimens were concentrated by pervaporation and allowed to prediffuse for two hours prior to addition of antigen. (Pappagianis, et al., personal communication)

**TEST PROCEDURE**

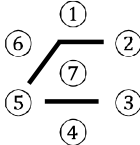
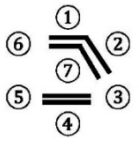
**A. Reconstitution of positive control serum.**

- Using a 1.0 mL pipet or tuberculin syringe add 0.95 mL of reagent quality water to the control serum vials.
- Gently "flick" the bottom of the vials to mix.
- Allow the vials to stand at room temperature for about 1 hour, occasionally inverting to mix. (Do not shake)
- If, on its first use, the positive control serum produces a negative result, it may be that sufficient reconstitution time was not allowed. In this case repeat the test ensuring that sufficient reconstitution time is allowed.
- Aliquot and freeze any control serum which will not be consumed within one month. (See **SHELF LIFE AND STORAGE**)

**B. Test procedure**

- Please refer to figures 1, 3 and 4 for proper arrangement of the test well pattern.
- Fill the control serum wells (1 & 4) of an appropriate ID plate for each fungal analyte to be tested.

**Figure 3.**

<p><b>FUNGAL IMMUNODIFFUSION ANALYSIS</b> (SAMPLE FORM)</p> <p>Plate No. <u>5</u>      Date <u>8-23-17</u></p> <p>Coccidioides "TP"</p> 	<p><b>FUNGAL IMMUNODIFFUSION ANALYSIS</b> (SAMPLE FORM)</p> <p>Plate No. <u>5</u>      Date <u>8-23-17</u></p> <p>Histoplasma</p> 
---	---

- Record the name, date, and/or lab number of the first patient on line 2 of the left hand column (figure 4) of the recording form and fill well 2 with the patient's serum. Using a fresh capillary tube/pipette tip for each patient, repeat this procedure for additional sera in wells 3, 5 and 6.
- Fill the center well with appropriate fungal antigen.
- Number and date the ID plate and the analysis form.
- Place the ID plate in a moist chamber and incubate at room temperature for 24 hours. Note: bands may be evident in as little as three to six hours for some sera. It will still be necessary to confirm the results of the other sera later.
- After 24 hours read and record the ID bands on the analysis form (figure 4). (See Reading the Test) An interim report should be issued at this point if no identity reactions are observed. Positive results should be reported immediately.
- An additional 48 hour incubation period is recommended to confirm a negative result. A final report is made at the conclusion of this period.

**Figure 4.**

Well Number	Histoplasmin Reading	Coccidioidin Reading
1. Control Serum	Histo Control	Cocci Control
2. CARTER, R. 3287	H and M BANDS	NEGATIVE
3. LESTER, C. 2519	NEGATIVE	NEGATIVE
4. Control Serum	Histo Control	Cocci Control
5. BARNES, T. 1362	NEGATIVE	NEGATIVE
6. HASKAMP, D. 1154	NEGATIVE	1 - BAND
7. Antigen	Histoplasmin	Coccidioidin
(Name, Date, Lab No., etc.)	After 24 hour incubation, draw bands observed on the well diagram above and record the number of bands on the blanks provided. NOTE: The control bands have been drawn on the well diagram above. If these bands are not observed on the plates after 24 hour incubation, the test is not valid and must be repeated.	

#### READING THE TEST

Any bright indirect light source may be used to aid in seeing the precipitin bands. A dark background is preferred. For instance, the plate may be held next to the shade of a high intensity lamp whose light beam is directed straight downward, over a black countertop. A bright direct light source may also be used if the plate is held in the light beam at a 45 degree angle against a dark background. Light boxes, providing indirect light against a dark background and prepared specifically for reading immunodiffusion plates, are also commercially available.

Particular attention should be paid to the orientation of bands produced by the patient serum in relation to the control bands. A smooth junction of the bands indicates an identity reaction. When patient antibody levels are low, only a slight bend in the control band toward a position in front of the patient well may be apparent. Should no reaction be observed between the positive control and the antigen, the test must be repeated.

#### INTERPRETATION OF RESULTS

A band of identity with the positive control indicates patient antibody against the fungal antigen in question. Partial identity reactions are also regarded as positive for antibody. Non-identity reactions are regarded as a negative test.<sup>11</sup>

#### QUALITY CONTROL

**This test should be performed per applicable local, state, or federal regulations or accrediting agencies.**

User quality control is performed on each test run by the inclusion of a positive control serum for each antigen. Positive control bands should be present at 24 hours. If these bands are not observed on the plates after the 24 hour incubation, the test is not valid and must be repeated. If a negative control is desired, a known negative patient may be used as negative control. The results obtained with the controls should be recorded in an appropriate log book to maintain high quality testing and comply with regulatory requirements.

**If the expected control reactions are not observed, repeat the control tests as the first step in determining the root cause of the failure. If control failures are repeated please contact Meridian's Technical Service Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.**

#### EXPECTED VALUES

In general, an identity reaction against a given antigen is indicative of active or recent past infection. Partial identity reactions are also important indicators of probable disease, especially when no identity reaction is seen among other agents. Non-identity reactions may be apparent when the disease state is caused by a mycotic agent other than the one tested. A non-identity reaction, however, is a negative test for the organism in question.

If activity against any of the fungal agents is observed, a vigorous attempt should be made to demonstrate the organism culturally for confirmation.

#### Histoplasmosis

The clinically significant antigens for *H. capsulatum* are designated "H" and "M" antigens. (Note: The "H" band appears closest to the antibody well while the "M" band is closest to the antigen well.) The "M" band has been found in about 63% of patients with active histoplasmosis, while the "H" band is apparent in only 27%. The "H" band is rarely observed in the absence of antibodies against the "M" antigen. The "M" band may appear in patients who have recently recovered from histoplasmosis as well as in the serum of previous histoplasmosis patients who have been recently skin tested.

Since the test may be negative in as many as 10% of culturally demonstrated cases, the absence of either an "H" or an "M" band does not rule out histoplasmosis.<sup>1, 21</sup>

#### Coccidiomycosis

Antibodies directed against the "F" antigen indicate active or recent past (up to 1 year) infection. The ID test is usually positive within four weeks after infection and remains positive throughout the clinically active disease.

Antibodies directed against the "TP" antigen indicate recent, active infection. These are primarily IgM antibodies which appear within several days of infection. This ID test is usually positive within 1 week after infection and reverts to negative within a few months.

Latex and complement fixation testing may provide important additional information regarding patient status.<sup>4-6</sup>

Crossreactions may be seen in patients harboring other systemic fungi (especially *H. capsulatum*) so care must be exercised when reading for identity reactions<sup>9, 18, 21</sup> (See **LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**). Partial identity reactions are also important indicators of probable disease. Nonidentity reactions may be apparent when the disease state is caused by a mycotic agent other than the one tested. A nonidentity reaction, however, is a negative test for the organism in question.

If activity against *Coccidioides immitis* is observed, a vigorous attempt should be made to demonstrate the organism culturally for confirmation.

#### LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The high rate of negative serologic tests observed among certain culturally demonstrable cases limits the predictive value of a negative test.<sup>20</sup>

## Fungal Immunodiffusion Reagents

**REF** 100201, 100401, 100405,  
100601, 100801, 101009,  
101012, 103001, 103101

**IVD**

Rx Only

## FINALITÀ D'USO

I reagenti per l'immunodiffusione fungina di Meridian Bioscience sono soluzioni standardizzate e purificate per la determinazione in vitro di precipitati antigene-anticorpo specifici per due patogeni fungini sistemici: *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) e *Coccidioides immitis* (*C. immitis*). I reagenti possono essere utilizzati per rilevare la presenza di anticorpi a *Coccidioides immitis* "TP" (recenti) o "F" (pregressi). Questi reagenti sono ottimizzati per l'utilizzo con il metodo di Ouchterlony o di immunodiffusione doppia.

## SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

*H. capsulatum* e *C. immitis* sono gli agenti eziologici delle micosi profonde. Questi funghi rappresentano una sfida diagnostica per medici e tecnici di laboratorio.

Mediante radiografia potrebbe essere difficile distinguere le lesioni provocate dai funghi sistemici da quelle causate da tubercolosi, neoplasie o tessuti cancerosi (benigni e maligni). I sintomi sono spesso trascurabili e talvolta possono essere confusi con quelli provocati da polmoniti, sarcoidosi, cancro e altre malattie difficili da rilevare la presenza di questi organismi in mezzi colturali e istologici, anche dopo ripetuti tentativi.<sup>3,7</sup>

Spesso la sierologia offre l'unica prova disponibile per formulare una diagnosi preliminare e condurre alla selezione di tecniche diagnostiche precise quali biopsia e coltura intensiva. Inoltre, la sierologia quantitativa, come il test di fissazione del complemento, è in grado di fornire importanti informazioni relative agli effetti della chemioterapia.<sup>18</sup>

I test di immunodiffusione fungina sono strumenti semplici e affidabili per la diagnosi di sospette micosi e per l'esecuzione di test sui sieri anticomplementari. I test forniscono inoltre dati specifici sulle reazioni ottenute con il metodo di fissazione del complemento. Non è necessario disporre di apparecchiature costose e le procedure sono sufficientemente semplici da potere essere eseguite presso qualsiasi laboratorio, per tale ragione rappresentano un eccellente metodo di screening.

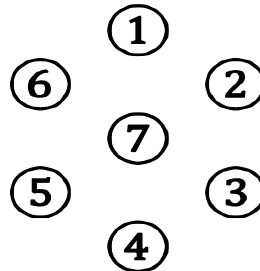
## PRINCIPI BIOLOGICI

I reagenti per l'immunodiffusione fungina di Meridian Bioscience si basano sul principio della doppia diffusione descritto da Oudin e Ouchterlony. Un anticorpo e il relativo antigene solubile vengono inseriti in pozzetti separati situati in un mezzo di diffusione di agarosio e lasciati diffondere all'esterno. Fra i due pozzetti si genera un gradiente di concentrazione di ciascuno dei componenti di reazione che varia da un eccesso di antigene in prossimità del pozzetto dell'anticorpo ad un eccesso di anticorpo in prossimità del pozzetto dell'antigene. Nel punto di equivalenza si forma una banda di precipitazione visibile.<sup>10-12</sup>

I pozzetti della piastra di immunodiffusione di Meridian sono disposti in modo tale da affiancare a ciascun pozzetto test del paziente un sistema noto di riferimento, in modo che le reazioni di identità siano chiaramente rilevabili (vedere figura 1).

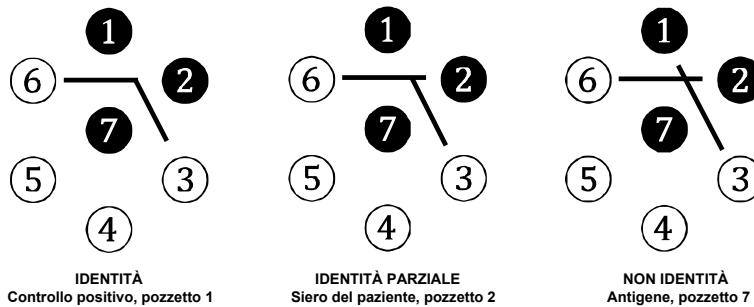
È possibile eseguire un test di "identità" degli antigeni o degli anticorpi posizionando un pozzetto di prova della sostanza in questione accanto ai pozzetti di un sistema noto. Se i complessi antigene-anticorpo sono identici, le linee di precipitazione formano una linea continua di identità con il sistema noto. Sono possibili anche reazioni di identità parziale o di non identità (vedere figura 2).

Figura 1. Disposizione dei sieri e degli antigeni nei pozzetti di immunodiffusione.



Siero di controllo positivo, pozzetti 1 e 4. Sieri del paziente, pozzetti 2, 3, 5 e 6. Antigene, pozzetto 7.

Figura 2. Identificazione delle bande di immunodiffusione



Una reazione di identità parziale si verifica nel caso in cui alcuni componenti degli antigeni (o degli anticorpi) siano identici e altri non lo siano. La "sporgenza" rappresenta i componenti non correlati. Nel caso in cui i complessi antigene-anticorpo siano differenti, si verificherà una reazione di non identità. La reazione "X" o crociata che ne risulta indica la presenza di due complessi non correlati.

## REAGENTI/MATERIALI FORNITI

- Antigeni:**
  - Istoplasmina: n. catalogo 100201, filtrato colturale miceliale purificato ricavato dalla crescita di *Histoplasma capsulatum* contenente gli antigeni "H" e "M" informato da 1,0 mL. Il preparato contiene 100 unità/mL\* di ciascun antigene. I lipidi, i componenti del mezzo e la maggior parte degli altri componenti antigenici sono stati rimossi. (Nota: la banda "H" appare più vicina al pozzetto dell'anticorpo mentre la banda "M" è più vicina al pozzetto dell'antigene.)
  - Coccidioidina "F": n. catalogo 100401 (1 mL) / N. catalogo 100405 (5 mL), gli antigeni *Coccidioides immitis* "F" sono disponibili nei formati da 1,0 mL e 5,0 mL. Gli antigeni disponibili sono costituiti da filtrati colturali contenenti gli antigeni "F" e "TP" di *Coccidioides immitis* ad una concentrazione di 100 unità/mL.\*
  - Coccidioidina "TP": n. catalogo 103001, antigeni "TP" di *Coccidioides immitis* costituiti da filtrati colturali purificati contenenti l'antigene "TP" di *Coccidioides immitis* nel formato da 1,0 mL. Il preparato contiene 100 unità/mL di antigene\* Gli antigeni contengono thimerosal come conservante ad una concentrazione finale pari a 1:10.000. Si consiglia tuttavia di prestare particolare attenzione al fine di evitare contaminazioni microbiche.

\*Queste unità sono standard interni di Meridian elaborato per assicurare una riproducibilità da lotto a lotto della concentrazione dell'antigene.

- Sieri di controllo:** i seguenti sieri di controllo liofilizzati vengono forniti in formato da 1,0 mL. Tutti i sieri di controllo sono allevati in capre iperimmuni contro preparati di antigene purificati.
  - Controllo positivo di istoplasmosi n. catalogo 100601: contiene anticorpi specifici diretti contro gli antigeni "H" e "M" di *H. capsulatum*. (Nota: la banda "H" appare vicina al pozzetto dell'anticorpo, mentre la banda "M" è più vicina al pozzetto dell'antigene.)
  - Controllo positivo di coccidioidomicosi "F" n. catalogo 100801: contiene anticorpi specifici diretti contro l'antigene "F" di *C. immitis*.
  - Controllo positivo di coccidioidomicosi "TP" n. catalogo 103101: contiene anticorpi specifici diretti contro l'antigene "TP" di *C. immitis*.

- Piastre di immunodiffusione:** le piastre di immunodiffusione contengono agarosio allo 0,9% in soluzione tampone glicina/fosfato a pH 7,4 + 0,2.
  - Piastre serie 1 (12 piastre/confezione) n. catalogo 101012: piastra di gel di agarosio con pozzetti per eseguire il test su quattro pazienti
  - Piastre serie 4 (9 piastre/confezione) n. catalogo 101009: piastra di gel di agarosio con pozzetti per eseguire il test su 16 pazienti.

**Nota:** per il test di *C. immitis* "TP" devono essere utilizzate le piastre serie 1. Per i test di *C. immitis* "F" e *H. capsulatum* è possibile utilizzare piastre serie 1 o serie 4.

**Nota:** gli ultimi progressi nell'elaborazione della piastra hanno consentito di eliminare l'utilizzo del fluido di intensificazione delle bande di immunodiffusione.

**Nota:** a causa della standardizzazione necessaria per produrre reagenti sierologici fungini di alta qualità di Meridian Bioscience, non è possibile garantire la sicurezza dei test con antigeni, sieri di controllo e piastre eseguiti con materiali diversi da quelli prodotti da Meridian Bioscience. L'utente si assume la piena responsabilità per eventuali modifiche alle procedure pubblicate nel presente opuscolo.

**MATERIALI E APPARECCHIATURE NECESSARI MA NON FORNITI**



1. Acqua distillata o deionizzata.
2. Camera umida: è possibile utilizzare qualsiasi contenitore come una capsula di Petri, un contenitore di plastica o un vasetto di vetro dotati di coperchio ermetico contenente carta da filtro umida o carta assorbente, purché le piastre ID siano fissate, piatte e rimangano idratate durante l'incubazione.
3. Luce da lettura. In commercio sono disponibili lettori di piastre in campo scuro; tuttavia è possibile elaborare un sistema soddisfacente utilizzando una lampada ad alta intensità la cui parte anteriore sia coperta da un foglio di carta nero nel quale viene ritagliato un tondo del diametro di 1-2 cm per lasciare filtrare la luce. In alternativa, è possibile posizionare la piastra a 45° di fronte a qualsiasi fonte luminosa indiretta in modo da ottenere una visualizzazione adeguata.
4. Pipetta, tubo capillare o equivalente.

**PRECAUZIONI**

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. Quando si maneggiano campioni di sangue, è necessario adottare misure adeguate per impedire la diffusione di agenti patogeni potenzialmente presenti nel campione.
3. I sieri di controllo sono conservati con sodio azide. L'accumulo di questa sostanza nelle tubature può costituire pericolo di esplosione. Si consiglia pertanto di smaltire il siero di controllo in eccesso negli appositi contenitori di raccolta o di gettarlo in uno scarico e sciacquare abbondantemente.

**DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA**

There are no known hazards associated with this product: 100201, 100401, 100405, 103001.

<b>REF</b> 100601 & 100801 & 103101   Control Serum	<b>Avvertenza:</b> Pericolo <b>Indicazioni di Pericolo:</b> H300 – Letale se ingerito H400 – Molto tossico per gli organismi acquatici H410 – Molto tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata EUH032 – A contatto con acidi libera un gas altamente tossico <b>Consigli di Prudenza – UE (§28, 1272/2008)</b> P301 + P310 - IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico
<b>REF</b> 101009 & 101012   Immunodiffusion Plates	<b>Avvertenza:</b> Avvertenza <b>Indicazioni di Pericolo:</b> H302 – Nocivo se ingerito

**STABILITÀ E CONSERVAZIONE**

Gli antigeni fungini devono essere conservati a una temperatura di 2-8 C. Congelare e scongelare ripetutamente gli antigeni è dannoso per gli antigeni stessi. Si consiglia di evitare temperature eccessive (superiori a 60 C). Se conservati a 2-8 C gli antigeni rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata su ciascuna fiala.

I sieri di controllo positivi sono stabili allo stato liofilizzato fino alla scadenza indicata su ciascuna fiala, se conservati a 2-8 C. Una volta ricostituiti, i sieri possono essere conservati a 2-8 C per un mese. Se non si prevede di utilizzarli entro un mese, si consiglia di frazionarli e congelarli a -20 C. Se conservati a una temperatura pari a -20 C si mantengono per almeno nove mesi. Si consiglia di evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. Durante l'utilizzo dei sieri di controllo positivo, tenerli a temperatura ambiente il meno possibile.

Le piastre di immunodiffusione devono essere conservate chiuse a una temperatura di 2-8 C fino alla data di scadenza indicata sulla confezione. Se le confezioni vengono aperte ed è necessario conservare le piastre prima di utilizzarle, occorre riporle in un contenitore umido a chiusura ermetica per evitare che si asciugano. Si consiglia di utilizzare un contenitore di plastica richiudibile contenente una piccola spugna o un panno umidi.

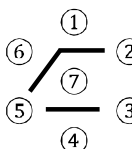
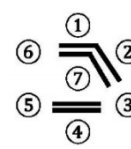
**RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

1. Per ottenere risultati ottimali, il siero deve essere sterile.
2. Se si ritarda il processamento dei campioni, è possibile conservarli in frigorifero fino ad un massimo di 72 ore. I campioni possono essere conservati per un massimo di sei mesi a una temperatura pari a -20 C senza alcuna perdita di attività, purché non vengano ripetutamente scongelati e ricongelati. Per ottenere risultati ottimali, i campioni trasportati da un laboratorio all'altro devono essere conservati a una temperatura pari a 2-8 C. Se necessario, i campioni possono essere conservati con thimerosal 1:10.000 o con sodio azide allo 0,1%.
3. È possibile ottenere una maggiore sensibilità durante l'esecuzione del test dell'anticorpo Cocci "TP" concentrando il siero del paziente 8:1.<sup>13-16</sup> Questa procedura può essere completata tramite la pervaporazione o l'utilizzo di un filtro a membrana con peso molecolare di cutoff pari a 125000 (ad esempio, Amicon™ B-125 o equivalenti). Sono disponibili diverse strategie per la pervaporazione ma il siero deve essere inserito in un tubo da dialisi di lunghezza ridotta, asciugato con aria o riscaldato con un essiccatore portatile finché non si ottiene la corretta riduzione di volume.
4. All'interno di uno studio clinico, è stato raggiunto un aumento della sensibilità del 15% concentrando i campioni mediante pervaporazione e lasciandoli diffondere per due ore prima di aggiungere l'antigene (comunicazione personale di Pappagianis, et al.).

**PROCEDURA DEL TEST**

- A. Ricostituzione del siero di controllo positivo.**
1. Utilizzando una pipetta da 1,0 mL o una siringa da tuberculina, aggiungere alle fiale del siero di controllo 0,95 mL di acqua distillata.
  2. Picchiettare leggermente sul fondo delle fiale per mescolare il contenuto.
  3. Lasciare le fiale per circa un'ora a temperatura ambiente capovolgendole di tanto in tanto per mescolarne il contenuto (senza agitare).
  4. Se al primo utilizzo il siero di controllo positivo produce un risultato negativo, il periodo di ricostituzione potrebbe non essere stato sufficiente. In questo caso, ripetere il test assicurandosi di concedere un tempo di ricostituzione sufficiente.
  5. Frizionare e congelare il siero di controllo che non verrà utilizzato entro un mese (vedere **STABILITÀ E CONSERVAZIONE**).
- B. Procedura del test**
1. Vedere le figure 1, 3, 4 per la corretta assegnazione dei pozzetti
  2. Riempire i pozzetti del siero di controllo (1 e 4) di una piastra ID appropriata per ciascun analita fungino da analizzare.

**Figura 3.**

<b>ANALISI DI IMMUNODIFFUSIONE FUNGINA</b> (MODULO DI ESEMPIO)  N. piastra <u>  5  </u> Data <u>  8-23-17  </u>  <b>Coccidioides "TP"</b>  	<b>ANALISI DI IMMUNODIFFUSIONE FUNGINA</b> (MODULO DI ESEMPIO)  N. piastra <u>  5  </u> Data <u>  8-23-17  </u>  <b>Histoplasma</b>  
---	---

3. Registrare il nome, la data e/o il numero di laboratorio del primo paziente nella seconda riga della colonna di sinistra (figura 4) del modulo di registrazione e riempire il pozzetto 2 con il siero del paziente. Ripetere questa procedura per ulteriori sieri nei pozzetti 3, 5 e 6, utilizzando una pipetta o un tubo capillare nuovi per ogni paziente.
4. Riempire il pozzetto centrale con l'antigene fungino appropriato.
5. Numerare e datare la piastra ID e il modulo di analisi.
6. Inserire la piastra ID in una camera umida e incubare a temperatura ambiente per 24 ore. Nota: per alcuni sieri le bande sono visibili già dopo 3-6 ore; sarà comunque necessario confermare i risultati degli altri sieri successivamente.
7. Trascorse le 24 ore, leggere e registrare le bande ID nel modulo di analisi (figura 4) (vedere la sezione Lettura del test). Se a questo punto non sono ancora state osservate reazioni, è necessario elaborare un rapporto temporaneo. I risultati positivi devono essere immediatamente annotati.
8. Prima di confermare un risultato negativo, si consiglia di prolungare il periodo di incubazione di altre 48 ore. Il rapporto finale viene redatto al termine di questo periodo.

Figura 4.

N. pozzetto		Letture Istoplasmina	Letture Coccidioidina
1.	Siero di controllo	Controllo Histo	Controllo Cocci
2.	CARTER, R. 3287	BANDE H e M	NEGATIVO
3.	LESTER, C. 2519	NEGATIVO	NEGATIVO
4.	Siero di controllo	Controllo Histo	Controllo Cocci
5.	BARNES, T. 1362	NEGATIVO	NEGATIVO
6.	HASKAMP, D. 1154	NEGATIVO	1 – BAND
7.	Antigene	Istoplasmina	Coccidioidina
(Nome, Data, N. laboratorio, ecc.)		Trascorse 24 ore di incubazione, disegnare le bande osservate nel diagramma dei pozzetti sopra riportato e registrare il numero di bande negli appositi spazi. <b>NOTA: le bande di controllo sono state disegnate nel diagramma dei pozzetti sopra riportato. Se dopo 24 ore di incubazione non si osserva alcuna banda sulle piastre, il test non è valido e deve essere ripetuto.</b>	

**LETTURA DEL TEST**

Per visualizzare al meglio le bande di precipitina, utilizzare una qualsiasi fonte luminosa indiretta. Si consiglia uno sfondo scuro. Ad esempio, è possibile posizionare la piastra accanto all'ombra di una lampada ad alta intensità il cui fascio di luce sia diretto verso il basso su di un piano di lavoro nero. Se la piastra è posizionata a 45° contro uno sfondo scuro, è possibile utilizzare anche una fonte luminosa diretta. Sono disponibili in commercio anche scatole luminose che emettono luce indiretta contro uno sfondo scuro, studiate specificatamente per la lettura delle piastre di immunodiffusione.

Prestare particolare attenzione all'orientamento delle bande prodotte dal siero del paziente in relazione alle bande di controllo. La presenza di un punto di congiunzione preciso delle bande indica una reazione di identità. In presenza di bassi livelli anticorpali del paziente, potrebbe apparire solo una leggera curvatura della banda di controllo in prossimità del pozzetto del paziente. Se non vengono osservate reazioni fra il controllo positivo e l'antigene, il test deve essere ripetuto.

**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**

Una banda di identità con il controllo positivo indica che nel siero del paziente è presente l'anticorpo all'antigene fungino in questione. Reazioni di identità parziale sono considerate positive per l'anticorpo. Reazioni di non identità sono considerate negative.<sup>11</sup>

**CONTROLLO QUALITÀ**

**Il test va eseguito conformemente ai requisiti stabiliti dai competenti enti locali, regionali, nazionali o dagli enti di accreditamento.**

Il controllo di qualità dell'utente viene eseguito su ogni test per cui è prevista l'inclusione di un siero di controllo positivo per ciascun antigene. Le bande di controllo positive dovrebbero essere visibili entro 24 ore. Se dopo 24 ore di incubazione non si osserva alcuna banda sulle piastre, il test non è valido e deve essere ripetuto. Se si desidera un controllo negativo, è possibile utilizzare un paziente negativo noto. I risultati ottenuti con i controlli devono essere annotati in un apposito registro per assicurare una qualità ottimale dei test e la conformità alle normative.

**Se non si ottengono i risultati attesi con i Controlli, come prima opzione per identificare la causa del fallimento ripetere i test di controllo. Se il fallimento dei test di controllo dovesse ripetersi, contattare il Servizio di Assistenza tecnica Meridian (negli USA 001-800-343-3858) o il Distributore Locale (in Italia, +390331433636).**

**VALORI ATTESI**

In generale, una reazione di identità a un determinato antigene indica infezioni attive o recenti. Anche le reazioni di identità parziale sono importanti indicatori della probabile presenza di malattie, soprattutto quando non si riscontra alcuna reazione di identità con altri antigeni. Se la malattia è causata da un agente micotico diverso da quello per il quale è stato eseguito il test, è possibile osservare reazioni di non identità. Una reazione di non identità rappresenta un test negativo per il solo organismo ricercato.

Se si osserva un'attività nei confronti di un agente fungino, si consiglia di confermare l'esistenza dell'organismo mediante coltura.

**Istoplasmosi**

Gli antigeni clinicamente significativi per *H. cap* sono designati come antigeni "H" e "M". (Nota: la banda "H" appare più vicina al pozzetto dell'anticorpo mentre la banda "M" è più vicina al pozzetto dell'antigene.) La banda "M" è stata osservata in circa il 63% dei pazienti con istoplasmosi attiva, mentre la banda "H" è presente solo nel 27% dei pazienti. La banda "H" viene osservata raramente in assenza di anticorpi contro l'antigene "M". La banda "M" può comparire nei pazienti guariti recentemente dall'istoplasmosi e nel siero di pazienti precedentemente affetti da istoplasmosi e sottoposti di recente a test cutaneo.

Poiché il test può risultare negativo in almeno il 10% dei casi dimostrati mediante coltura, l'assenza di una banda "H" o di una banda "M" non esclude l'istoplasmosi.<sup>1,21</sup>

**Coccidiomicosi**

La presenza di anticorpi contro l'antigene "F" indica un'infezione attiva o recente (fino a 1 anno). Il test ID risulta in genere positivo a partire da 4 settimane dopo l'infezione e rimane tale per tutto il corso della malattia.

La presenza di anticorpi contro l'antigene "TP" indica un'infezione attiva o recente. Si tratta principalmente di anticorpi IgM che compaiono entro alcuni giorni dall'infezione. Il test ID risulta positivo a partire da una settimana dopo l'infezione e ritorna negativo dopo pochi mesi.

Il test di fissazione del complemento e la prova al lattice possono fornire ulteriori importanti informazioni in merito allo stato del paziente.<sup>4-6</sup>

È possibile rilevare la presenza di reazioni crociate in pazienti affetti da altri funghi sistemici (in particolare *H. cap*); pertanto è necessario prestare particolare attenzione durante la lettura delle reazioni di identità<sup>9, 18, 21</sup> (vedere la sezione **LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**). Anche le reazioni di identità parziale sono importanti indicatori della probabile presenza di malattia. Se la malattia è causata da un agente micotico diverso da quello per il quale è stato eseguito il test, è possibile osservare reazioni di non identità. Una reazione di non identità rappresenta un test negativo per il solo organismo ricercato.

Se si osserva un'attività nei confronti di *Coccidioides immitis*, si consiglia di confermare l'esistenza dell'organismo mediante coltura.

**LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA**

L'alta percentuale di test sierologici negativi osservati in determinati casi dimostrabili con la coltura, limita il valore predittivo di un test negativo.<sup>20</sup>

## Fungal Immunodiffusion Reagents

REF 100201, 100401, 100405,  
100601, 100801, 101009,  
101012, 103001, 103101

IVD

Rx Only

## BUT DE LA METHODE

Les réactifs d'immunodiffusion de Meridian Bioscience sont des préparations standardisées et purifiées pour la détermination in vitro des anticorps précipitants de deux pathogènes fongiques systémiques : *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) et *Coccidioides immitis* (*C. immitis*). Les réactifs sont disponibles pour la détection des anticorps *Coccidioides immitis* « TP » (précoces) ou « F » (tardifs). Ces réactifs sont optimisés pour une utilisation avec la méthode de double diffusion d'Ouchterlony.

## RESUME ET EXPLICATION DU TEST

*H. capsulatum* et *C. immitis* sont des agents causaux des mycoses profondes. Ces mycètes présentent un défi diagnostique aussi bien pour les laboratoires de microbiologie que pour les médecins.

Radiographiquement, les lésions provoquées par des mycètes systémiques peuvent être difficiles à distinguer des lésions tuberculeuses, des néoplasmes, des tissus cancéreux (bénins et malins) et entre elles. Les symptômes n'ont souvent rien de particulièrement remarquable et peuvent ressembler à ceux associés à diverses maladies telles que la pneumonie, la sarcoïdose, le cancer et autres. Ces organismes peuvent être difficiles à démontrer, aussi bien en culture qu'en histologie, même après plusieurs tentatives.<sup>3,7</sup>

Le recours à la sérologie est souvent le seul moyen d'orienter le traitement, de suggérer un pronostic ou de déboucher sur la sélection de techniques de diagnostic plus définitives, telles que la culture intensive ou la biopsie. Par ailleurs, la sérologie quantitative, comme la réaction de fixation du complément, peut fournir des informations essentielles sur les effets de la chimiothérapie.<sup>18</sup>

Les systèmes d'immunodiffusion fongique sont des outils d'évaluation fiables et simples à utiliser en cas de mycoses suspectées. Ces procédures permettent de tester des sérums anticorps complémentaires. Les tests permettent également d'obtenir des données de spécificité sur les réactions obtenues grâce à la méthode de réaction de fixation du complément. Aucun matériel coûteux n'est nécessaire et les procédures sont suffisamment simples pour être réalisées par n'importe quel laboratoire. Ces systèmes constituent donc une excellente méthode de dépistage.

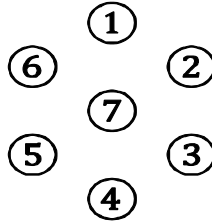
## PRINCIPE DU TEST

Les réactifs d'immunodiffusion fongique de Meridian Bioscience sont basés sur le principe de la double diffusion comme décrit par Oudin et Ouchterlony. Celui-ci consiste à placer, dans deux puits distincts creusés dans un gel d'agarose, un anticorps et son antigène soluble homologue, puis à les laisser se diffuser vers l'extérieur. Entre les deux puits, un gradient de concentration de chacun des composants de la réaction est établi, allant de l'excès d'antigène à l'endroit le plus proche du puits de l'anticorps jusqu'à l'excès d'anticorps à l'endroit le plus proche du puits de l'antigène. Une ligne visible de précipité se forme au point d'équivalence.<sup>10-12</sup>

La disposition des puits de la plaque d'immunodiffusion de Meridian a été conçue de sorte à ce que chaque puits de test du patient dispose d'un système connu de référence pour que les réactions d'identité soient facilement identifiables. (Voir figure 1)

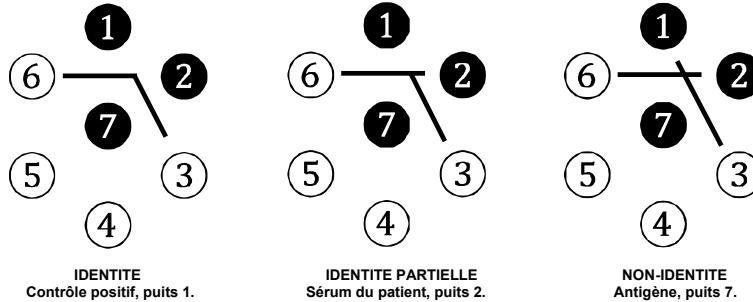
L'« identité » des antigènes ou des anticorps peut être testée en plaçant un puits de test de la substance analysée à côté des puits d'un système connu. Si les complexes antigène-anticorps sont identiques, les lignes de précipité forment une ligne continue d'identité avec le système connu. Des réactions d'identité partielle et de non-identité sont aussi possibles. (Voir figure 2)

Figure 1. Disposition des sérums et des antigènes dans une disposition de puits d'immunodiffusion.



Sérum positif de contrôle, puits 1 et 4. Sérums du patient, puits 2, 3, 5 et 6. Antigène, puits 7.

Figure 2. Identification des bandes d'immunodiffusion



Une réaction d'identité partielle se produit quand certains composants des antigènes (ou anticorps) sont identiques et d'autres non. Le « crochet » représente les composants qui ne sont pas liés entre eux. Une réaction de non-identité se produit lorsque les complexes antigène-anticorps sont différents. La forme « X » ou croisée qui en résulte indique que deux complexes non liés entre eux sont présents.

## MATERIEL FOURNI

## 1. Antigènes :

- Histoplasmine : Référence 100201, filtrat de culture mycélien purifié issu de la croissance de *Histoplasma capsulatum* contenant les antigènes « H » et « M » en flacon de 1,0 mL. La préparation contient 100 unités/mL\* de chaque antigène. Les lipides, les composants du milieu et la plupart des autres composants antigéniques ont été éliminés. (Remarque : La bande « H » apparaît plus proche du puits d'anticorps tandis que la bande « M » est plus proche du puits d'antigène.)
- Coccidioidine « F » : Référence 100401 (1 mL) / Référence 100405 (5 mL), les antigènes de coccidioides « F » sont disponibles en flacons de 1,0 mL et 5,0 mL. Les antigènes disponibles sont des filtrats de culture contenant les antigènes « F » et « TP » de *Coccidioides immitis* à une concentration de 100 unités/mL.\*
- Coccidioidine « TP » : Référence 103001, antigène de coccidioides « TP » composé de filtrats de culture purifiés contenant l'antigène « TP » de *Coccidioides immitis* dans un flacon de 1,0 mL. La préparation contient 100 unités/mL d'antigène\*

Les antigènes contiennent du thimérosal à une concentration finale de 1:10 000 comme conservateur. Un soin particulier doit cependant être apporté pour éviter toute contamination microbienne.

\*Ces unités sont des étalons internes de Meridian conçus uniquement pour garantir la reproductibilité de la concentration en antigène d'un lot à l'autre.

## 2. Sérums de contrôle : Les sérums de contrôle lyophilisés suivants sont fournis en flacons de 1,0 mL. Les sérums de contrôle contiennent du sérum de chèvre, de lapin ou humain avec des anticorps dirigés contre leurs antigènes respectifs. Ces sérums de contrôle contiennent 0,1% d'azote de sodium comme conservateur. Des précautions doivent être prises pour éviter la contamination microbienne.

- Contrôle positif de l'histoplasmose, Référence 100601 : Contient des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes « H » et « M » de *H. capsulatum*. (Remarque : la bande « H » apparaît près du puits d'anticorps, tandis que la bande « M » est plus proche du puits d'antigène.)
- Contrôle positif de la coccidiomyose « F », Référence 100801 : Contient des anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène « F » de *C. immitis*.
- Contrôle positif de la coccidiomyose « TP », Référence 103101 : Contient des anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène « TP » de *C. immitis*.

## 3. Plaques d'immunodiffusion : Les plaques d'immunodiffusion se composent de 0,9 % d'agarose dans un tampon de glycine/phosphate d'un pH de 7,4 + 0,2.

- Plaques 1 série (12 plaques/boîte) Référence 101012 : Plaques de gel d'agarose avec puits pour tester quatre patients par plaque.
- Plaques 4 séries (9 plaques/boîte) Référence 101009 : Plaques de gel d'agarose avec puits pour tester 16 patients par plaque.

Remarque : Les plaques 1 série doivent être utilisées pour tester *C. immitis* « TP ». Des plaques 1 série ou 4 séries peuvent être utilisées pour tester *C. immitis* « F » et *H. capsulatum*.

Remarque : Les récentes avancées en termes de formulation de plaques ont éliminé la nécessité de recourir au liquide intensificateur de bande d'immunodiffusion.

Remarque : Du fait de la standardisation nécessaire à la production de réactifs sérologiques fongiques de haute qualité de Meridian Bioscience, les performances de tests avec des antigènes, des sérums de contrôle et des plaques en conjonction avec des matériaux autres que ceux produits par Meridian Bioscience, Inc. ne peuvent pas être garanties. L'utilisateur assume l'entière responsabilité en cas de modification des procédures publiées dans le présent document.

### MATERIAUX ET EQUIPEMENTS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS


1. Eau de qualité « réactif ».
2. Chambre humide ; n'importe quel récipient tel qu'une boîte de Petri, une boîte en plastique ou un flacon de verre doté d'un couvercle à fermeture hermétique contenant du papier filtre ou des serviettes de papier humide(s) est suffisant tant que les plaques ID sont immobiles, de niveau et restent hydratées pendant l'incubation.
3. Lampe de lecture. Des lecteurs de plaque foncés sont disponibles sur le marché, cependant, un système satisfaisant peut être conçu à l'aide d'une lampe à haute intensité où l'avant du réflecteur protecteur de l'ampoule a été recouvert de papier de construction noir avec un petit trou (de 1-2 cm de diamètre) découpé pour l'éclairage. Ou alors, la plaque peut être maintenue à un angle de 45 degrés vers presque n'importe quelle source indirecte de lumière pour une visualisation adéquate.
4. Pipette, tube capillaire, ou équivalent


### PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs destinés à un usage diagnostique in vitro.
2. Quand vous manipulez des échantillons sanguins, des mesures adéquates doivent être prises pour empêcher la dissémination des agents étiologiques potentiellement présents dans l'échantillon.
3. Les sérums de contrôle sont préservés avec de l'azote de sodium. L'accumulation de ce produit chimique dans les canalisations de plomberie métalliques peut présenter un risque d'explosion. Il est donc recommandé de mettre l'excès de sérum de contrôle au rebut dans une poubelle pour déchets appropriée ou de le déverser dans le tuyau de vidange dilué dans une grande quantité d'eau de rinçage.

### DANGER ET MISES EN GARDE

There are no known hazards associated with this product: 100201, 100401, 100405, 103001.

REF 100601 & 100801 & 103101	
 Control Serum	<b>Mention d'avertissement:</b> Danger <b>Mentions de danger:</b> H300 – Mortel en cas d'ingestion H400 – Très toxique pour les organismes aquatiques H410 – Très toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme EUH032 – Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique <b>Conseils de prudence – UE (par 28, 1272/2008)</b> P301 + P310 - EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin

REF 101009 & 101012	
 Immunodiffusion Plates	<b>Mention d'avertissement:</b> Attention <b>Mentions de danger:</b> H302 – Nocif en cas d'ingestion

### DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Les antigènes fongiques doivent être conservés à température réfrigérée (2-8 C). La répétition de cycles de congélation et de décongélation altère ces antigènes. La chaleur extrême (plus de 60 C) doit aussi être évitée. Quand ils sont conservés à 2-8 C, les antigènes sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur chaque flacon.

Les sérums de contrôle positifs sont stables à l'état lyophilisé jusqu'à la date d'expiration indiquée sur chaque flacon quand ils sont conservés à 2-8 C. Une fois reconstitués, les sérums peuvent être conservés à 2-8 C pendant un mois. Si les sérums ne vont pas être utilisés dans le mois, ils doivent être aliquotés et congelés à -20 C. A -20 C, une durée de vie de neuf mois minimum est possible. Eviter les cycles de congélation et de décongélation répétés. Quand les sérums de contrôle positifs sont en cours d'utilisation, veiller à ce que la durée d'exposition à température ambiante soit la plus courte possible.

Les plaques d'immunodiffusion doivent être conservées dans leur emballage fermé à 2-8 C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage. Si les emballages des plaques sont ouverts et que les plaques doivent être conservées avant utilisation, il est conseillé de les conserver dans un récipient humide fermé hermétiquement pour éviter le dessèchement. Un récipient en plastique refermable avec une petite éponge ou une serviette humide est idéal.

### PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

1. Pour des résultats optimaux, veillez à obtenir le sérum du patient de manière aseptique.
2. En cas de délai dans le traitement de l'échantillon, une réfrigération pendant un maximum de 72 heures est autorisée. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à six mois à -20 C sans perte d'activité tant qu'ils ne sont pas décongelés et recongelés à plusieurs reprises. Les échantillons en transit entre laboratoires doivent être conservés à 2-8 C pour des résultats optimaux. Les échantillons peuvent être préservés avec du thimérosal 1:10 000 ou de l'azote de sodium à 0,1 % si nécessaire.
3. Une plus grande sensibilité peut être obtenue en réalisant le test de l'anticorps « TP » en concentrant le sérum du patient à environ 8:1<sup>13-16</sup>. Cela peut être accompli par pervaporation ou utilisation d'un filtre à membrane de poids moléculaire sélectif de 125 000 (ex. Amicon™ B-125 ou équivalent). Il existe différentes stratégies pour la pervaporation, mais le sérum peut simplement être placé dans une courte longueur de tubulure de dialyse et séché à l'air ou délicatement réchauffé avec un sèche-mains jusqu'à obtenir la réduction de volume correcte.
4. Dans une étude clinique limitée, une augmentation de 15 % de sensibilité a été obtenue après pervaporation des échantillons puis prédiffusion pendant deux heures avant l'ajout de l'antigène. (Pappagianis, et al., communication personnelle)

### PROCEDURE DE TEST

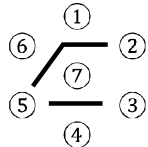
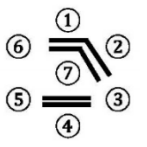
#### A. Reconstitution de sérum de contrôle positif.

1. A l'aide d'une pipette de 1,0 mL ou d'une seringue de tuberculination, ajouter, 0,95 mL d'eau de qualité « réactif » aux flacons de sérum de contrôle.
2. Retourner doucement le fond des flacons pour mélanger.
3. Laisser les flacons reposer à température ambiante pendant 1 heure, retourner occasionnellement pour mélanger. (Ne pas secouer)
4. Si, à sa première utilisation, le sérum de contrôle positif produit un résultat négatif, il est possible que le temps de reconstitution n'ait pas été suffisant. Si tel est le cas, répéter le test en veillant à laisser un temps de reconstruction suffisant.
5. Aliquoter et congeler tout sérum de contrôle qui n'est pas consommé dans le mois. (Voir la section **DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE**)

#### B. Procédure de test

1. Se reporter aux figures 1, 3 et 4 pour la disposition correcte des puits de test.
2. Remplir les puits de sérum de contrôle (1 et 4) d'une plaque ID appropriée pour chaque analyte fongique à tester.

Figure 3.

ANALYSE FONGIQUE PAR IMMUNODIFFUSION (FORMULAIRE ECHANTILLON)	ANALYSE FONGIQUE PAR IMMUNODIFFUSION (FORMULAIRE ECHANTILLON)
Plaque No. <u>5</u> Date <u>8-23-17</u> <b>Coccidioides « TP »</b> 	Plaque No. <u>5</u> Date <u>8-23-17</u> <b>Histoplasme</b> 

3. Indiquer le nom, la date et/ou le numéro d'identification au laboratoire du premier patient sur la ligne 2 de la colonne de gauche (Figure 4) du formulaire d'analyse et remplir le puits 2 avec le sérum du patient. A l'aide d'un nouveau tube capillaire/poignée de pipette pour chaque patient, répéter cette procédure pour les sérums supplémentaires dans les puits 3, 5 et 6.
4. Remplir le puits central avec l'antigène fongique approprié.
5. Numéroté et dater la plaque ID et le formulaire d'analyse.
6. Placer la plaque ID dans une chambre humide et l'incuber à température ambiante pendant 24 heures. Remarque : il est possible que les bandes commencent à être visibles dès trois à six heures pour certains sérums. Il sera nécessaire de vérifier les résultats des autres sérums plus tard.
7. Après 24 heures, lire et enregistrer les bandes observées sur le formulaire d'analyse (Figure 4). (Cf. la section Résultat). Un rapport provisoire doit être émis à ce stade si aucune réaction d'identité n'est observée. Tout résultat positif doit être rapporté immédiatement.
8. Une période d'incubation supplémentaire de 48 heures est recommandée pour confirmer un résultat négatif. Un rapport final est fait à la fin de cette période.

Figure 4.

Numéro de puits		Résultat histoplasmine	Résultat coccidioïdine
1.	<u>Sérum de contrôle</u>	<u>Contrôle histo</u>	<u>Contrôle cocci</u>
2.	<u>CARTER, R. 3287</u>	<u>BANDES H et M</u>	<u>NEGATIF</u>
3.	<u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIF</u>	<u>NEGATIF</u>
4.	<u>Sérum de contrôle</u>	<u>Contrôle histo</u>	<u>Contrôle cocci</u>
5.	<u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIF</u>	<u>NEGATIF</u>
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>NEGATIF</u>	<u>1 – BANDE</u>
7.	<u>Antigène</u>	<u>Histoplasmine</u>	<u>Coccidioïdine</u>
(Nom, Date, N° Labo., etc.)		Après une incubation de 24 heures, dessiner les bandes observées sur le diagramme du puits ci-dessus et enregistrer le nombre de bandes dans les espaces vierges fournis. REMARQUE : Les bandes de contrôle ont été dessinées sur le diagramme du puits ci-dessus. Si ces bandes ne sont pas observées sur les plaques après une incubation de 24 heures, le test n'est pas valide et doit être répété.	

**LECTURE DU TEST**

N'importe quelle source d'éclairage indirecte forte peut être utilisée pour aider à voir les bandes de précipité. Il est préférable de disposer d'un fond de couleur foncée. Par exemple, la plaque peut être maintenue à côté de l'abat-jour d'une lampe à haute intensité dont le rayon de lumière est dirigé directement vers le bas, au-dessus d'une surface noire. Une source d'éclairage forte peut aussi être utilisée si la plaque est maintenue dans le rayon lumineux à un angle de 45 degrés contre un fond de couleur foncée. Des cabines d'éclairage fournissant une lumière indirecte contre un fond de couleur foncée et préparées spécifiquement pour la lecture des plaques d'immunodiffusion sont aussi disponibles dans le commerce.

Prêter une attention particulière à l'orientation des bandes produites par le sérum du patient par rapport aux bandes de contrôle. Une jonction lisse des bandes indique une réaction d'identité. Quand les niveaux d'anticorps du patient sont bas, il est possible qu'une légère courbure de la bande de contrôle vers une position devant le puits du patient soit visible. Si aucune réaction n'est observée entre le contrôle positif et l'antigène, le test doit être répété.

**INTERPRETATION DES RESULTATS**

Une bande d'identité avec le contrôle positif indique la présence d'un anticorps du patient contre l'antigène fongique en question. Des réactions d'identité partielle sont aussi considérées comme positives pour l'anticorps. Les réactions de non-identité sont considérées comme des tests négatifs.<sup>11</sup>

**CONTROLE DE QUALITE**

**Ce test doit être réalisé en fonction des exigences des réglementations locales et/ou nationales ou des directives des organismes d'accréditation.**

Un contrôle de qualité est réalisé par l'utilisateur sur chaque lot de test en incluant un sérum de contrôle positif pour chaque antigène. Les bandes de contrôle positives doivent être présentes dans les 24 heures. Si ces bandes ne sont pas observées sur les plaques après l'incubation de 24 heures, le test n'est pas valide et doit être répété. Si vous souhaitez un contrôle négatif, vous pouvez utiliser un patient négatif connu comme contrôle négatif. Les résultats obtenus avec les contrôles doivent être enregistrés dans un journal approprié pour assurer la qualité des tests et se conformer aux exigences réglementaires.

**Si les réactions attendues ne sont pas observées, la première étape pour déterminer la cause de l'échec est de répéter les tests de contrôle. Contacter le Service Technique de Meridian Bioscience ou votre distributeur local pour assistance si les résultats de contrôle escomptés ne sont pas observés de façon répétée.**

**VALEURS ATTENDUES**

En général, une réaction d'identité contre un antigène donné indique une infection active ou passée. Des réactions d'identité partielle sont aussi des indicateurs importants d'une maladie probable, particulièrement quand aucune réaction d'identité n'est observée parmi les autres analytes. Des réactions de non-identité peuvent être visibles quand l'état de maladie est causé par un agent mycotique autre que celui qui est testé. Toutefois, une réaction de non-identité est un test négatif pour l'organisme en question.

Si une activité vis-à-vis de n'importe quel des agents fongiques est observée, il faut impérativement tenter de confirmer la présence de l'organisme par culture.

**Histoplasmose**

Les antigènes d'importance clinique pour *H. capsulatum* sont désignés comme étant les antigènes « H » et « M ». (Remarque : La bande « H » apparaît plus proche du puits d'anticorps tandis que la bande « M » est plus proche du puits d'antigène.) La bande « M » a été trouvée dans environ 63 % des patients atteints d'histoplasmose active, tandis que la bande « H » n'est visible que dans 27 % d'entre eux. La bande « H » est rarement observée en l'absence d'anticorps contre l'antigène « M ». La bande « M » peut apparaître chez les patients qui ont récemment récupéré de l'histoplasmose ainsi que dans le sérum d'anciens patients atteints d'histoplasmose qui ont récemment été testés sur la peau.

Comme le test peut être négatif pour une proportion de cas démontrés par culture pouvant atteindre 10 %, l'absence d'une bande « H » ou « M » n'exclut pas l'histoplasmose.<sup>1, 21</sup>

**Coccidiomycose**

Les anticorps dirigés contre l'antigène « F » indiquent une infection active ou passée, mais récente (jusqu'à 1 an). Le test d'immunodiffusion est habituellement positif dans les quatre semaines après l'infection et reste positif tout au long de la maladie cliniquement active.

Les anticorps dirigés contre l'antigène « TP » indiquent une infection active récente. Il s'agit principalement des antigènes IgM qui apparaissent après quelques jours d'infection. Ce test d'immunodiffusion est habituellement positif 1 semaine après l'infection et redevient négatif après quelques mois.

Le test du latex et la réaction de fixation du complément peuvent offrir des informations supplémentaires importantes concernant l'état du patient.<sup>4, 6</sup>

Il est possible que des réactions croisées se produisent sur des patients possédant d'autres mycètes systémiques (particulièrement *H. capsulatum*), il faut donc procéder avec soin lors de la lecture des réactions d'identité<sup>9, 18, 21</sup> (Voir la section **LIMITES DU TEST**). Les réactions d'identité partielle sont aussi des indicateurs importants d'une maladie probable. Des réactions de non-identité peuvent être visibles quand l'état de maladie est causé par un agent mycotique autre que celui qui est testé. Toutefois, une réaction de non-identité est un test négatif pour l'organisme en question.

Si une activité contre le *Coccidioides immitis* est observée, il faut impérativement tenter de confirmer la présence de l'organisme par culture.

**LIMITES DU TEST**

Le taux élevé de tests sérologiques négatifs observés chez certains cas démontrés par culture limite la valeur prédictive d'un test négatif.<sup>20</sup>

## Fungal Immunodiffusion Reagents

REF 100201, 100401, 100405,  
100601, 100801, 101009,  
101012, 103001, 103101

IVD

Rx Only

**USO INDICADO**  
Los reactivos de inmunodifusión de Meridian Bioscience son preparaciones estandarizadas y purificadas para la determinación *in vitro* de precipitinas de dos patógenos micóticos sistémicos: *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) y *Coccidioides immitis* (*C. immitis*). Hay reactivos disponibles para la detección tanto de anticuerpos tempranos ("TP") como tardíos ("F") contra *Coccidioides immitis*. Estos reactivos han sido optimizados para usarse en la técnica de doble difusión de Ouchterlony.

**RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA**

*H. capsulatum* y *C. immitis* son los agentes causales de las micosis profundas. El diagnóstico de estos hongos supone un reto para el laboratorio de microbiología y para el médico.

Las lesiones radiográficas producidas en las micosis sistémicas pueden ser difíciles de diferenciar entre sí y de las lesiones tuberculosas, las neoplasias y los tejidos tumorales (benignos y malignos). Con frecuencia, los síntomas no son especialmente destacables, y pueden asemejarse a los de varios tipos de neumonías, sarcoidosis, cánceres y otras enfermedades. La detección de los microorganismos mediante cultivos y estudios histológicos, aún después de repetidos intentos, puede resultar difícil<sup>5-7</sup>.

Con frecuencia, las serologías ofrecen la única vía disponible para orientar el tratamiento, sugerir un pronóstico o ayudar a seleccionar técnicas de diagnóstico más definitivas, como el cultivo intensivo o la biopsia. Además, las técnicas de serología cuantitativa, como por ejemplo la prueba de fijación del complemento, pueden proporcionar información importante con respecto a los efectos de la quimioterapia<sup>18</sup>.

Las pruebas de detección de hongos por inmunodifusión son una herramienta simple y confiable para determinar la presencia de micosis. Con esta técnica pueden analizarse sueros anticomplemento. El test también proporciona datos de especificidad de las reacciones obtenidas mediante el método de fijación del complemento. Puesto que es simple y no requiere equipos costosos, la técnica de inmunodifusión puede realizarse en cualquier laboratorio y constituye un excelente método de diagnóstico.

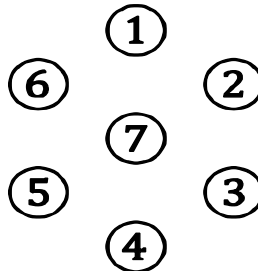
**PRINCIPIOS BIOLÓGICOS**

Los reactivos de detección de hongos por inmunodifusión de Meridian Bioscience se basan en el principio de doble difusión descrito por Oudin y Ouchterlony. Un anticuerpo y su antígeno homólogo soluble se dispensan en pocillos separados excavados en un medio de difusión de agarosa y se deja que difundan hacia la periferia. Entre los dos pocillos se establece un gradiente de concentración de cada uno de los componentes de la reacción que va desde la zona de exceso de antígeno más próxima al pocillo del anticuerpo hasta la zona de exceso de anticuerpo más próxima al pocillo del antígeno. En el punto de equivalencia se forma una línea visible de precipitado<sup>10-12</sup>.

Los patrones de los pocillos de la placa de inmunodifusión de Meridian están dispuestos de modo tal que proporcionan a cada pocillo de la prueba del paciente un sistema de referencia conocido que pone claramente de manifiesto las reacciones de identidad. (Véase la figura 1.)

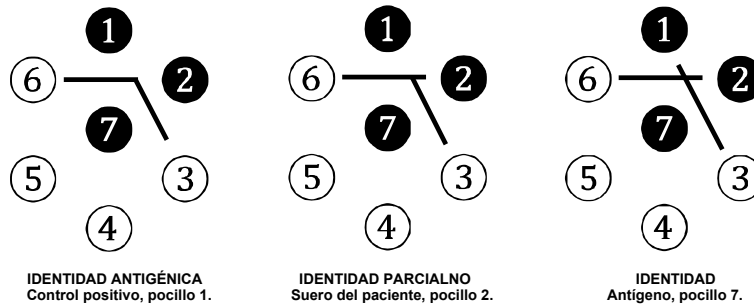
Es posible analizar la "identidad" de los antígenos o los anticuerpos colocando un pocillo con la sustancia que se va a analizar al lado de los pocillos de un sistema conocido. Si los complejos antígeno-anticuerpo son idénticos, la precipitación forma una línea de identidad continua con el sistema conocido. También se pueden producir reacciones de identidad parcial o de no identidad. (Véase la figura 2.)

Figura 1. Disposición de los sueros y antígenos en el patrón de pocillos de inmunodifusión.



Suero de control positivo, pocillos 1 y 4. Sueros de pacientes, pocillos 2, 3, 5 y 6. Antígeno, pocillo 7.

Figura 2. Identificación de las bandas de inmunodifusión



Una reacción de identidad parcial ocurre cuando ciertos componentes de los antígenos (o anticuerpos) son idénticos y otros no lo son. La "espuela" representa los componentes que no están relacionados. Cuando los complejos antígeno-anticuerpo son diferentes se produce una reacción de no identidad. La "X" o reacción cruzada que resulta indica la presencia de dos complejos no relacionados.

**REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS**

**1. Antígenos:**

- Histoplasmina: referencia 100201, un filtrado de cultivo purificado de micelios de *Histoplasma capsulatum* en crecimiento que contiene los antígenos "H" y "M" en un tamaño de 1,0 mL. La preparación contiene 100 unidades/mL de cada antígeno. Se han eliminado los lípidos, los componentes del medio y la mayoría de los demás componentes antigénicos. (Nota: La banda "H" es la que aparece más próxima al pocillo del anticuerpo, mientras que la banda "M" es la más próxima al pocillo del antígeno.)
- Coccidioidina "F": referencia 100401 (1 mL) / referencia 100405 (5 mL), los antígenos "F" de *Coccidioides* están disponibles en tamaños de 1,0 mL y 5,0 mL. Los antígenos disponibles consisten en filtrados de cultivos que contienen los antígenos "F" y "TP" de *Coccidioides immitis* a una concentración de 100 unidades/mL.
- Coccidioidina "TP": referencia 103001, antígeno "TP" de *Coccidioides* consistente en filtrados de cultivos purificados que contienen antígeno "TP" de *Coccidioides immitis* en un tamaño de 1,0 mL. La preparación contiene 100 unidades/mL de antígeno.

Los antígenos contienen tiomersal como conservante a una concentración final de 1:10.000. Sin embargo, se debe tener cuidado al manejarlos para evitar la contaminación microbiana de los mismos.

\*Estas unidades constituyen estándares internos de Meridian diseñados únicamente para garantizar la reproducibilidad de la concentración del antígeno entre los distintos lotes.

- Sueros de control:** Los siguientes sueros de control liofilizados se suministran en un tamaño de 1,0 ml. Todos los sueros de control se generan en cabras hiperinmunes contra preparaciones de antígenos purificados.
  - Control positivo de histoplasmosis, referencia 100601: contiene anticuerpos específicos dirigidos contra los antígenos "H" y "M" de *H. capsulatum*. (Nota: La banda "H" es la que aparece cerca del pocillo del anticuerpo, mientras que la banda "M" es la más próxima al pocillo del antígeno.)
  - Control positivo "F" de coccidiomicosis, referencia 100801: contiene anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno "F" de *C. immitis*.
  - Control positivo "TP" de coccidiomicosis, referencia 103101: contiene anticuerpos específicos dirigidos contra el antígeno "TP" de *C. immitis*.

- Placas de inmunodifusión (ID):** Las placas de inmunodifusión están compuestas de agarosa al 0,9 % en tampón fosfato/glicina a pH 7,4 + 0,2.
  - Placas de la serie 1 (12 placas/paquete), referencia 101012: Placa de gel de agarosa con pocillos para analizar a cuatro pacientes por placa.
  - Placas de la serie 4 (9 placas/paquete), referencia 101009: Placa de gel de agarosa con pocillos para analizar a 16 pacientes por placa.

**Nota:** Las placas de la serie 1 deben usarse para analizar antígenos "TP" de *C. immitis*. Las placas de la serie 1 o la serie 4 se pueden usar para analizar antígenos "F" de *C. immitis* y *H. capsulatum*.

**Nota:** Los recientes avances en la formulación de las placas eliminan la necesidad de usar un líquido intensificador de las bandas de inmunodifusión.

**Nota:** Debido a que es necesario estandarizar la producción de reactivos de alta calidad para la detección de hongos en suero, no se puede garantizar el rendimiento de los antígenos, los sueros de control y las placas si los materiales no provienen de Meridian Bioscience, Inc. El usuario asume toda la responsabilidad por cualquier modificación de los procedimientos descritos en este prospecto.

**MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS**


1. Agua de calidad para reactivos.
2. Cámara húmeda. Cualquier recipiente adecuado (placa de Petri, caja de plástico o frasco de vidrio con una tapa bien ajustada) que contenga un papel de filtro o una toalla de papel húmedos es un recipiente satisfactorio siempre que las placas de ID no se muevan, estén niveladas y se mantengan hidratadas durante la incubación.
3. Luz para la lectura. Hay lectores de placas de campo oscuro comerciales; sin embargo, se puede usar de forma satisfactoria una lámpara de alta intensidad si se cubre la pantalla reflectora con una cartulina negra en la que se haya recortado un pequeño orificio (1-2 cm de diámetro) para que pase la luz. Para ver bien la placa, también puede sostenerse en un ángulo de 45 grados frente a casi cualquier fuente de luz indirecta brillante.
4. Pipeta, tubo capilar o equivalente


**PRECAUCIONES**

1. Todos los reactivos son solo para uso diagnóstico in vitro.
2. Al manipular muestras de sangre, deben tomarse medidas adecuadas para evitar la diseminación de agentes etiológicos que pudieran estar presentes en la muestra.
3. Los sueros de control se conservan con azida de sodio. La acumulación de este producto químico en las tuberías metálicas de los desagües puede conllevar riesgos de explosión. Por eso se recomienda desechar el suero de control sobrante en un recipiente apropiado o eliminarlo por el desagüe con un chorro de agua abundante.

**DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN**

There are no known hazards associated with this product: 100201, 100401, 100405, 103001.

REF 100601 & 100801 & 103101	
 Control Serum	<b>Palabras de advertencia:</b> Peligro <b>Indicaciones de peligro:</b> H300 – Mortal en caso de ingestión H400 – Muy tóxico para los organismos acuáticos H410 – Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos EUH032 – En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos <b>Consejos de prudencia – UE (§28, 127/2008)</b> P301 + P310 – EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico

REF 101009 & 101012	
 Immunodiffusion Plates	<b>Palabras de advertencia:</b> Peligro <b>Indicaciones de peligro:</b> H302 – Nocivo en caso de ingestión

**VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO**

Los antígenos micóticos se conservan mejor refrigerados (2-8 C). Congelarlos y descongelarlos repetidas veces es perjudicial para estos antígenos. También deben evitarse temperaturas extremas que superen los 60 C. Los antígenos almacenados a 2-8 C se mantienen estables hasta la fecha de caducidad indicada en el vial.

Si se conservan a 2-8 C, los sueros de control positivo se mantienen estables liofilizados hasta la fecha de caducidad indicada en el vial. Una vez reconstituidos, los sueros se pueden conservar a 2-8 C durante un mes. Si los sueros no se van a utilizar antes de un mes, conviene dividirlos en alícuotas y congelarlos a -20 C. Almacenados a -20 C la viabilidad esperada es como mínimo de nueve meses. No deben congelarse y descongelarse repetidas veces. Mientras se estén usando, los sueros de control positivo deben permanecer a temperatura ambiente el mínimo tiempo posible.

Las placas de inmunodifusión deben almacenarse sin abrir a 2-8 C hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. Si se abren los envases de las placas y se tienen que almacenar antes de poder usarlas, deben guardarse en un recipiente herméticamente cerrado y húmedo para evitar que se sequen. Lo ideal es usar un recipiente de plástico con una pequeña esponja o una toalla húmeda que se pueda volver a cerrar herméticamente.

**RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

1. Para que los resultados sean óptimos, obtenga el suero del paciente en condiciones asépticas.
2. Si la ejecución del test se demora, la muestra puede almacenarse en el refrigerador hasta 72 horas. Las muestras pueden almacenarse hasta seis meses a -20 C sin pérdida de actividad, siempre que no se descongelen y vuelvan a congelar repetidas veces. Las muestras que se transporten de un laboratorio a otro deben mantenerse a 2-8 C para obtener los mejores resultados. Las muestras pueden conservarse con tiomersal en proporción 1:10.000 o con azida de sodio al 0,1 % si es necesario.
3. Al hacer la prueba de anticuerpos contra el antígeno "TP" de Coccidioides, se puede conseguir mayor sensibilidad concentrando el suero del paciente en proporción 8:1.<sup>13-16</sup> Esta concentración puede conseguirse mediante pervaporación o usando un filtro de membrana con un límite de peso molecular de 125.000 (por ejemplo, Amicon™ B-125 o equivalente). Aunque existen varias estrategias para la pervaporación, basta simplemente con colocar el suero en un tramo corto de un tubo para diálisis y secarlo con aire o calentarlo suavemente con un secador de mano hasta alcanzar la reducción de volumen adecuada.
4. En un estudio clínico de alcance limitado, se observó un aumento de la sensibilidad del 15 % tras concentrar las muestras por pervaporación y dejarlas difundir durante dos horas antes de añadir el antígeno (comunicación personal de Pappagianis y col.).

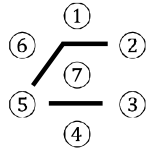
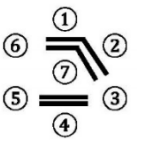
**PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA****A. Reconstitución del suero de control positivo.**

1. Con una pipeta de 1,0 mL o una jeringuilla para tuberculina, añada 0,95 mL de agua de calidad para reactivos a los viales de suero de control.
2. Golpee ligeramente el fondo de los viales para mezclar.
3. Deje reposar los viales a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora, invirtiéndolos de vez en cuando para mezclar el contenido. No los sacuda.
4. Si la primera vez que se usa, el suero de control positivo da un resultado negativo, es posible que el tiempo de reconstitución no haya sido suficiente. En ese caso, repita la prueba dejando suficiente tiempo para la reconstitución.
5. Divida en alícuotas y congele cualquier suero de control que no se vaya a usar en el plazo de un mes. (Véase VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO.)

**B. Procedimiento del test**

1. Consulte las figuras 1, 3 y 4 para ver cuál es la disposición correcta del patrón de los pocillos del test.
2. Llene los pocillos del suero de control (1 y 4) de una placa de ID apropiada para cada analito micótico que vaya a analizar.

**Figura 3.**

<b>ANÁLISIS DE INMUNODIFUSIÓN PARA HONGOS</b> (EJEMPLO DE LA FICHA DE REGISTRO)  Placa n.º <u>5</u> Fecha <u>23-8-17</u>  "TP" de Coccidioides  	<b>ANÁLISIS DE INMUNODIFUSIÓN PARA HONGOS</b> (EJEMPLO DE LA FICHA DE REGISTRO)  Placa n.º <u>5</u> Fecha <u>23-8-17</u>  Histoplasma  
--	---

3. Anote el nombre, la fecha y el número de laboratorio del primer paciente en la línea 2 de la columna izquierda (figura 4) de la ficha del libro de registro, y llene el pocillo 2 con el suero del paciente. Usando un tubo capilar o una punta de pipeta nuevos para cada paciente, repita este procedimiento para los demás sueros en los pocillos 3, 5 y 6.
4. Llene el pocillo del centro con el antígeno micótico correspondiente.
5. Numere y ponga la fecha en la placa de ID y en la ficha del libro de registro.
6. Coloque la placa de ID en una cámara húmeda e incuba a temperatura ambiente durante 24 horas. Nota: En el caso de algunos sueros pueden aparecer bandas en tan solo 3-6 horas. Aun así, será necesario confirmar más tarde los resultados de los otros sueros.
7. Al cabo de 24 horas, lea y registre las bandas de ID en la ficha de registro (figura 4). (Véase Lectura del test) Si no se observa ninguna reacción de identidad en este momento, debe emitirse un informe provisional. Los resultados positivos deben comunicarse inmediatamente.
8. Para confirmar un resultado negativo se recomienda extender el periodo de incubación otras 48 horas. Al término de este período se hace un informe final.

Figura 4.

Número de pocillos		Lectura de histoplasmina	Lectura de coccidioidina
1.	<u>Suero de control</u>	<u>Control Histo</u>	<u>Control Cocci</u>
2.	<u>CARTER, R. 3287</u>	<u>BANDAS H y M</u>	<u>NEGATIVO</u>
3.	<u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>
4.	<u>Suero de control</u>	<u>Control Histo</u>	<u>Control Cocci</u>
5.	<u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>NEGATIVO</u>	<u>1 – BANDA</u>
7.	<u>Antígeno</u>	<u>Histoplasmina</u>	<u>Coccidioidina</u>
(Nombre, Fecha, N.º laboratorio, etc.)		Después de incubar durante 24 horas, dibuje las bandas que observe en el diagrama de pocillos anterior y registre el número de bandas en los espacios en blanco provistos para ello. NOTA: En el diagrama de pocillos anterior se han incluido las bandas de control. Si no se observan estas bandas en las placas después de 24 horas de incubación, el test no es válido y se tiene que repetir.	

#### LECTURA DEL TEST

Puede usarse cualquier fuente de luz brillante indirecta para visualizar las bandas de precipitinas. Es preferible usar un fondo oscuro. Por ejemplo, se puede sostener la placa al lado de la pantalla de una lámpara de alta intensidad con el haz de luz dirigido directamente hacia abajo contra una mesa negra. También se puede utilizar una fuente de luz directa brillante si la placa se coloca a 45 grados en el paso del haz de luz y contra un fondo oscuro. También existen negatoscopios comerciales que proporcionan una luz indirecta contra un fondo oscuro, específicamente preparados para leer placas de inmunodifusión.

Debe prestarse especial atención a la orientación de las bandas producidas por el suero del paciente en relación con las bandas de control. Una convergencia uniforme de las bandas indica una reacción de identidad. Cuando el título de anticuerpos del paciente es bajo, puede que solo se aprecie una ligera curvatura de la banda de control hacia el punto situado delante del pocillo del paciente. Si no se observa ninguna reacción entre el control positivo y el antígeno, es necesario repetir el test.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una banda de identidad con el control positivo indica la presencia de un anticuerpo del paciente contra el antígeno micótico en cuestión. Las reacciones de identidad parcial también se consideran un resultado positivo para el anticuerpo. Las reacciones de no identidad se consideran un resultado negativo del test.<sup>11</sup>

#### CONTROL DE CALIDAD

**Este ensayo debe ser realizado siguiendo las regulaciones de acreditación locales, estatales o federales.**

El usuario hace un control de calidad de cada serie del test incluyendo un suero de control positivo por cada antígeno. Las bandas de control positivo deben estar presentes a las 24 horas. Si no se observan estas bandas en las placas después de 24 horas de incubación, el ensayo no es válido y se tiene que repetir. Si se quiere incluir un control negativo, puede usarse para ello el suero de un paciente con resultados negativos confirmados. Los resultados de los controles deben anotarse en un libro de registro apropiado a los efectos de mantener la calidad de las pruebas y cumplir con las estipulaciones de los organismos regulatorios.

**Si los resultados esperados para el control no son observados, repita la prueba de control como primer paso para determinar la causa de la falla. Si se repite la falla luego de repetir el control contacte el Departamento de Servicios Técnicos de Meridian al 1-800-343-3858 (USA) o su distribuidor local.**

#### VALORES ESPERADOS

Por lo general, una reacción de identidad contra un determinado antígeno indica una infección activa o una infección anterior pero reciente. Las reacciones de identidad parcial también son indicadores importantes de una probable enfermedad, especialmente si no se observa ninguna reacción de identidad entre otros agentes. Cuando la enfermedad se debe a un hongo diferente del que se está analizando pueden aparecer reacciones de no identidad. Sin embargo, una reacción de no identidad es un resultado negativo para el microorganismo en cuestión.

En caso de observarse actividad contra cualquiera de los hongos, debe hacerse un intento serio de detectar el microorganismo en cultivos para confirmar el diagnóstico.

#### Histoplasmosis

Los antígenos de trascendencia clínica para *H. capsulatum* se denominan antígenos "H" y "M". (Nota: La banda "H" es la que aparece más próxima al pocillo del anticuerpo, mientras que la banda "M" es la más próxima al pocillo del antígeno.) La banda "M" se ha encontrado en aproximadamente el 63 % de los pacientes con histoplasmosis activa, mientras que la banda "H" solo aparece en el 27 %. La banda "H" rara vez se observa en ausencia de anticuerpos contra el antígeno "M". La banda "M" puede aparecer en pacientes que se han recuperado recientemente de una histoplasmosis, así como en el suero de pacientes con antecedentes de histoplasmosis que se han sometido recientemente a pruebas cutáneas.

Como la prueba puede dar resultados negativos hasta en un 10 % de los casos positivos confirmados en cultivos, la ausencia de una banda "H" o "M" no descarta la histoplasmosis.<sup>1,21</sup>

#### Coccidiomicosis

Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno "F" indican una infección activa o una infección anterior pero reciente (máximo de un 1 año). La prueba de ID suele dar un resultado positivo dentro de las cuatro semanas posteriores a la infección y sigue siendo positiva durante el transcurso de la enfermedad clínica activa.

Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno "TP" indican una infección activa y reciente. Son principalmente anticuerpos de tipo IgM que aparecen durante los primeros días de la infección. Esta prueba de ID suele dar positivo a partir de la primera semana de la infección y vuelve a ser negativa a los pocos meses.

Las pruebas de aglutinación en látex y fijación del complemento pueden proporcionar importante información adicional sobre el estado del paciente.<sup>4-6</sup>

Es posible observar reacciones de inmunidad cruzada en pacientes con infecciones diseminadas de otros hongos (especialmente *H. capsulatum*), por lo cual debe tenerse un cuidado especial al leer las reacciones de identidad<sup>9, 18, 21</sup> (véase **LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**). Las reacciones de identidad parcial también son indicadores importantes de una probable enfermedad. Cuando la enfermedad se debe a un hongo diferente del que se está analizando pueden aparecer reacciones de no identidad. Sin embargo, una reacción de no identidad es un resultado negativo para el microorganismo en cuestión.

En caso de observarse actividad contra el antígeno de *Coccidioides immitis*, debe hacerse un intento serio de detectar el microorganismo en cultivos para confirmar el diagnóstico.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La elevada tasa de test serológicos negativos que se ha observado en casos positivos confirmados mediante cultivo limita el valor predictivo de un test negativo.<sup>20</sup>

## Fungal Immunodiffusion Reagents

REF 100201, 100401, 100405,  
100601, 100801, 101009,  
101012, 103001, 103101

IVD

Rx Only

## VERWENDUNGSZWECK

Die Immundiffusionsreagenzien von Meridian Bioscience sind standardisierte, gereinigte Präparate für den In-vitro-Nachweis der präzipitierenden Antikörper zu zwei systemischen Pilzerregern: *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*) und *Coccidioides immitis* (*C. immitis*). Die Reagenzien sind zum Nachweis von entweder „TP“ (frühen) oder „F“ (späten) Antikörpern zu *Coccidioides immitis* verfügbar. Diese Reagenzien wurden für den Gebrauch im Rahmen der Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony optimiert.

## ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

*H. capsulatum* und *C. immitis* sind die auslösenden Erreger von tiefliegender Mykosen. Diese Pilze stellen eine diagnostische Herausforderung für den Arzt und mikrobiologische Labore dar.

Röntgenologisch können die von den systemischen Pilzen hervorgerufenen Läsionen schwer voneinander, sowie von tuberkulösen Läsionen Neoplasmen und von (sowohl gut als auch bösartig) Krebsgewebe zu unterscheiden sein. Die Symptome sind oft unauffällig und können verschiedenen Pneumonien, Sarkoidosen, Karzinomen und anderen Erkrankungen ähnlich sein. Die Organismen sind kulturell und histologisch schwierig nachzuweisen, selbst bei wiederholten Versuchen.<sup>3-7</sup>

Oft bieten serologische Untersuchungen den einzig verfügbaren Nachweis für die Behandlung, um Prognosen vorzuschlagen oder um zur Auswahl von definitiveren diagnostischen Verfahren wie z. B. einer intensiven Kultur oder Biopsie zu führen. Außerdem kann die quantitative Serologie wie z. B. komplementäre Fixationstestung wichtige Hinweise auf die Wirkung der Chemotherapie bieten.<sup>18</sup>

Die Pilzimmundiffusionstests sind einfache, verlässliche Werkzeuge bei der Bewertung von verdächtigen Mykosen. Antikomplementäre Seren können mit diesen Verfahren getestet werden. Die Tests bieten darüber hinaus spezifische Daten zu Reaktionen, die mit der komplementären Fixationsmethode erhalten wurden. Es ist keine teure Ausrüstung notwendig und die Verfahren sind einfach genug, so dass sie von jedem Labor durchgeführt werden können und dadurch ausgezeichnete Screeningmethoden darstellen.

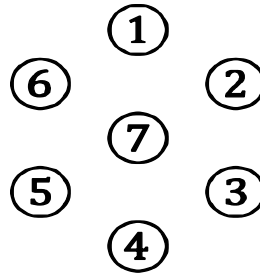
## BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Die Pilzimmundiffusionsreagenzien von Meridian Bioscience beruhen auf dem von Oudin und Ouchterlony beschriebenen Prinzip der Doppeldiffusion. Ein Antikörper und sein homologes, lösliches Antigen werden in getrennte Wells gegeben, die in ein Agarose-Diffusionsmedium geschnitten werden, und nach außen diffundieren. Zwischen den beiden Wells bildet sich ein Konzentrationsgradient von den einzelnen Reaktionskomponenten, der von dem Antigenüberschuss, der dem Antikörperwell am nächsten liegt, bis zum Antikörperüberschuss, der dem Antigenwell am nächsten liegt, reicht. Eine sichtbare Präzipitalinie bildet sich am Äquivalenzpunkt.<sup>10-12</sup>

Die Wellmuster der Immundiffusionsplatte von Meridian sind so angeordnet, dass sie jedem Patiententestwell ein bekanntes Referenzsystem zur Verfügung stellen, so dass Identitätsreaktionen leicht zu erkennen sind. (Siehe Abbildung 1.)

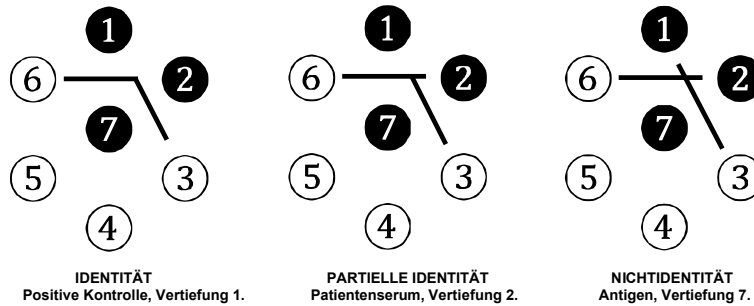
Antigene oder Antikörper können auf ihre „Identität“ hin getestet werden, indem ein Testwell mit der in Frage stehenden Substanz neben den Vertiefungen eines bekannten Systems positioniert wird. Wenn die Antigen-Antikörperkomplexe identisch sind, bilden die Präzipitalinien eine durchgehende Identitätslinie mit dem bekannten System. Partielle und Nicht-Identitätsreaktionen sind ebenfalls möglich. (Siehe Abbildung 2.)

Abbildung 1. Anordnung der Seren und Antigene im Immundiffusionswellmuster.



Kontrollpositives Serum, Vertiefung 1 & 4. Patientenserum, Vertiefungen 2, 3, 5 & 6. Antigen, Vertiefung 7.

Abbildung 2. Identifizierung von Immundiffusionsbändern



Eine partielle Identitätsreaktion tritt auf, wenn bestimmte Komponenten der Antigene (oder der Antikörper) identisch, andere dagegen nicht identisch sind. Der „Sporn“ repräsentiert die Komponenten, die nicht verwandt sind. Eine Nicht-Identitätsreaktion tritt auf, wenn die Antigen-Antikörper-Komplexe unterschiedlich sind. Die sich ergebende „X“- oder gekreuzte Reaktion ist ein Hinweis, dass zwei nicht verwandte Komplexe vorhanden sind.

## MITGELIEFERTE REAGENZIEN/MATERIALIEN

## 1. Antigene:

- Histoplasmin: Katalognr. 100201, ein gereinigtes Myzelienkulturfiltrat aus der Anzucht von *Histoplasma capsulatum* mit „H“- und „M“-Antigenen zu 1,0 mL. Die Zubereitung enthält 100 Einheiten/mL jedes Antigens. Lipide, Medienbestandteile und die meisten anderen Antigenbestandteile wurden entfernt. (Hinweis: Das „H“-Band erscheint dem Antikörperwell am nächsten, während das „M“-Band dem Antigenwell am nächsten ist.)
- Coccidioidin „F“: Katalognr. 100401 (1 mL)/Katalognr. 100405 (5 mL), Coccidioides-„F“-Antigene sind zu 1,0 mL und 5,0 mL erhältlich. Die lieferbaren Antigene bestehen aus gereinigten Kulturfiltraten mit den „F“- und „TP“-Antigenen von *Coccidioides immitis* zu einer Konzentration von 100 Einheiten/mL.\*
- Coccidioidin „TP“: Katalognr. 103001, Coccidioides-„TP“-Antigen aus gereinigten Kulturfiltraten mit dem „TP“-Antigen von *Coccidioides immitis* zu 1,0 mL. Die Zubereitung enthält 100 Einheiten/mL des Antigens.\* Die Antigene enthalten Thimerosal in einer Endkonzentration von 1:10.000 als Konservierungsmittel. Es sollte achtgegeben werden, dass eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.

\*Diese Einheiten sind interne Standards von Meridian und sind lediglich dazu bestimmt, eine Wiederholbarkeit der Antigenkonzentration von Charge zu Charge zu gewährleisten.

## 2. Kontrollseren: Das folgende lyophilisierte Kontrollserum ist zu 1,0 mL erhältlich. Die Kontrollseren enthalten Ziegen-, Kaninchen- oder Humanserum mit gegen ihre jeweiligen Antigene gerichteten Antikörpern. Diese Kontrollseren werden mit 0,1% Natriumazid konserviert. Um eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden, ist Vorsicht geboten.

- Histoplasma-Positive Kontrolle Katalognr. 100601: Enthält spezifische Antikörper, die gegen die „H“- und „M“-Antigene von *H. capsulatum* gerichtet sind. (Hinweis: Das „H“-Band erscheint dem Antikörperwell am nächsten, während das „M“-Band dem Antigenwell am nächsten ist.)
- Coccidioidomykose-„F“-positive Kontrolle Katalognr. 100801: Enthält spezifische Antikörper, die gegen das „F“-Antigen von *C. immitis* gerichtet sind.
- Coccidioidomykose-„TP“-positive Kontrolle Katalognr. 103101: Enthält spezifische Antikörper, die gegen das „TP“-Antigen von *C. immitis* gerichtet sind.

## 3. Immundiffusionsplatten: Die Immundiffusionsplatten bestehen aus 0,9 % Agarose in Glycin/Phosphatpuffer zu einem pH von 7,4 ± 0,2.

- 1 Serie von Platten (12 Platten/Packung) Katalognr. 101012: Agarose-Gelplatte mit Vertiefungen zum Testen von vier Patienten pro Platte.
- 4 Serien von Platten (9 Platten/Packung) Katalognr. 101009: Agarose-Gelplatte mit Vertiefungen zum Testen von 16 Patienten pro Platte.

Hinweis: 1 Serie von Platten muss für das Testen auf *C. immitis* „TP“ verwendet werden. 1 Serie oder 4 Serien von Platten können für das Testen auf *C. immitis* „F“ und *H. capsulatum* verwendet werden.

Hinweis: Durch aktuelle Fortschritte bei der Plattenformulierung ist die Verwendung einer Immundiffusions-Bandintensivierungsflüssigkeit nicht mehr notwendig.

Hinweis: Aufgrund der für die Produktion von qualitativ hochwertigen Meridian Bioscience Fungalserologiereagenzien notwendigen Standardisierung kann die Testleistung, die mit Antigenen, Kontrollseren und Platten mit Materialien erzielt wird, die nicht von Meridian Bioscience Inc. hergestellt wurden, nicht garantiert werden. Der Verbraucher übernimmt die volle Verantwortung für jegliche Veränderung des hierin veröffentlichten Verfahrens.

## NOTWENDIGE MATERIALIEN UND AUSRÜSTUNG, DIE NICHT IM LIEFERUMFANG ENTHALTEN SIND


1. Wasser von Reagenzqualität.
2. Feuchte Kammer: jeder angemessene, mit einem fest schließenden Deckel ausgerüstete Behälter, wie z. B. eine Petrischale, eine Plastikschachtel oder ein Glasbecher, in den ein feuchtes Filterpapier oder Papiertuch gegeben wird, ist unter der Voraussetzung angebracht, dass die ID-Platten stationär und eben stehen und während der Inkubation hydriert bleiben.
3. Leseleuchte. Dunkelfeld-Plattenleser sind im Handel erhältlich, allerdings kann ein zufriedenstellendes System erstellt werden, indem man eine Hochintensitätsleuchte verwendet, bei der die Vorderseite des Birnschutzreflektors mit schwarzer Pappe ausgerüstet wird, in die zur Beleuchtung ein kleines Loch (1–2 cm im Durchmesser) geschnitten wird. Als Alternative kann die Schale in einem 45°-Winkel zu fast jeder hellen indirekten Lichtquelle gehalten werden, um eine angemessene Visualisierung zu erreichen.
4. Pipette, Kapillarröhrchen oder vergleichbares


## VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Beim Umgang mit Blutproben sollten geeignete Maßnahmen getroffen werden, um die Verbreitung von möglicherweise in der Probe vorhandenen ätiologischen Agenzien zu verhindern.
3. Die Kontrollseren werden mit Natriumazid konserviert. Die Ablagerung dieser Chemikalie in Metallabflussrohren kann eine Explosionsgefahr darstellen. Daher wird empfohlen, das überschüssige Kontrollserum entweder einfach in einem angemessenen Abfallbehälter zu entsorgen oder es mit sehr viel Wasser den Abfluss hinunter zu spülen.

## GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

There are no known hazards associated with this product: 100201, 100401, 100405, 103001.

REF 100601 & 100801 & 103101	
 Control Serum	<b>Signalwort:</b> Gefahr <b>Gefahrenhinweise:</b> H300 – Lebensgefahr bei Verschlucken H400 – Sehr giftig für Wasserorganismen H410 – Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung EUH032 – Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase <b>Sicherheitshinweise – Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008</b> P301 + P310 – BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen

REF 101009 & 101012	
 Immundiffusion Plates	<b>Signalwort:</b> Achtung <b>Gefahrenhinweise:</b> H302 – Gesundheitsschädlich bei Verschlucken

## HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Pilzantigene werden am besten bei Kühltemperaturen (2–8 C) gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren schadet diesen Antigenen. Extreme Hitze (mehr als 60 C) ist ebenfalls zu vermeiden. Bei einer Lagertemperatur von 2–8 C sind die Antigene bis zu dem auf dem jeweiligen Fläschchen angegebenen Verfalldatum haltbar.

Die positiven Kontrollseren sind im lyophilisierten Zustand bis zu dem auf dem jeweiligen Fläschchen angegebenen Verfalldatum haltbar, wenn sie bei 2–8 C gelagert werden. Nach der Rekonstitution können die Seren bei 2–8 C einen Monat lang gelagert werden. Werden die Seren nicht innerhalb eines Monat verbraucht, sollten sie aliquotiert und bei -20 C eingefroren werden. Bei -20 C kann eine Mindesthaltbarkeit von neun Monaten erwartet werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren sollte vermieden werden. Wenn die positiven Kontrollseren in Gebrauch sind, sollte der Zeitraum bei Raumtemperatur so kurz wie möglich gehalten werden.

Immundiffusionsplatten sind ungeöffnet und bei einer Lagertemperatur von 2–8 C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar. Wenn Plattenpackungen geöffnet werden und die Platten vor Gebrauch gelagert werden, müssen sie in einem fest verschlossenen, feuchten Behälter aufbewahrt werden, damit ein Austrocknen verhindert wird. Ein wiederverschließbarer Plastikbehälter mit einem kleinen, feuchten Schwamm oder Tuch ist ideal.

## PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

1. Optimale Ergebnisse werden erzielt, wenn das Serum unter aseptischen Bedingungen vom Patienten entnommen wird.
2. Wenn bei der Bearbeitung der Probe eine Verzögerung entsteht, kann die Probe bis zu 72 Stunden lang gekühlt gelagert werden. Proben können bis zu sechs Monate lang bei -20 C eingefroren werden und verlieren ihre Aktivität nicht, vorausgesetzt, dass sie nicht wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren werden. Proben, die von einem Labor zum anderen transportiert werden, sollten bei 2–8 C gehalten werden, um optimale Ergebnisse erzielen zu können. Die Proben können wenn notwendig mit Thimerosal im Verhältnis 1:10.000 oder 0,1 % Natriumazid konserviert werden.
3. Es kann ein höherer Grad an Sensibilität erzielt werden, wenn der Cocci-„TP“-Antikörpertest durchgeführt wird, indem das Serum des Patienten auf ungefähr 8:1 konzentriert wird.<sup>13-16</sup> Dies kann durch Pervaporation oder die Verwendung von einem Membranfilter mit einem Cutoff-Molekulargewicht von 125.000 (z. B. Amicon™ B-125 oder ein Äquivalent) erreicht werden. Obwohl es verschiedene Strategien zur Pervaporation gibt, kann das Serum einfach in ein kurzes Stück Dialyseschlauch gegeben werden und dann luftgetrocknet oder leicht mit einem Handtrockner erwärmt werden, bis die angemessene Volumenverminderung erreicht wird.
4. In einer begrenzten klinischen Studie wurde eine 15%ige Erhöhung der Sensibilität beobachtet, wenn die Proben durch Pervaporation konzentriert und zwei Stunden lang prädiffundiert wurden, bevor die Antigene hinzugegeben wurden (Pappagianis et al., persönliche Mitteilung).

## TESTDURCHFÜHRUNG

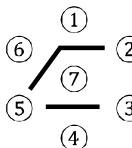
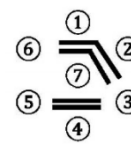
### A. Rekonstitution des positiven Kontrollserums.

1. Geben Sie mit einer 1,0-mL-Pipette oder einer Tuberkulinspritze 0,95 mL Wasser von Reagenzqualität in die Kontrollserumfläschchen.
2. „Schnippsen“ Sie vorsichtig gegen den Boden der Fläschchen, um den Inhalt zu mischen.
3. Lassen Sie die Fläschchen ungefähr 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen und drehen Sie sie gelegentlich um, um den Inhalt zu mischen (nicht schütteln).
4. Wenn das positive Kontrollserum bei der ersten Verwendung ein negatives Ergebnis erzeugt, könnte dies an einer zu kurzen Rekonstitutionszeit liegen. Wiederholen Sie in diesem Fall den Test bei angemessener Rekonstitutionszeit.
5. Aliquotieren Sie Kontrollserum, das nicht innerhalb eines Monats verbraucht wird, und frieren Sie sie ein. (Siehe **HALTBARKEIT UND LAGERUNG**.)

### B. Testverfahren

1. Verfahren Sie bitte nach den Abbildungen 1, 3 und 4 für die korrekte Anordnung des Testwellmusters.
2. Befüllen Sie die Kontrollserumwells (1 und 4) einer entsprechenden ID-Platte für jeden zu testenden Pilzanalyt.

Abbildung 3.

<b>FUNGALE IMMUNDIFFUSIONSANALYSE</b> (BEISPIELFORMULAR)  Platten-Nr. <u>5</u> Datum <u>8-23-17</u>  Coccidioides „TP“  	<b>FUNGALE IMMUNDIFFUSIONSANALYSE</b> (BEISPIELFORMULAR)  Platten-Nr. <u>5</u> Datum <u>8-23-17</u>  Histoplasma  
--	--

3. Geben Sie den Namen, das Datum und/oder die Labornummer des ersten Patienten in der 2. Zeile der linken Spalte (siehe Abbildung 4) des Registrierungsformulars an und füllen Sie die Vertiefung 2 mit dem Serum des Patienten. Verwenden Sie ein frisches Kapillarröhrchen/eine Pipettenspitze für jeden Patienten und wiederholen Sie auf diese Weise das Verfahren für die zusätzlichen Seren in den Vertiefungen 3, 5 und 6.
4. Füllen Sie das die Vertiefung in der Mitte mit dem entsprechenden Pilzantigen.
5. Nummerieren und datieren Sie die ID-Platte und das Analyseformular.
6. Stellen Sie die ID-Platte in eine feuchte Kammer und inkubieren Sie sie 24 Stunden lang bei Raumtemperatur. Hinweis: Bei einigen Seren können Bänder nach nur drei bis sechs Stunden erscheinen. Trotzdem ist es notwendig, die Ergebnisse der anderen Seren später zu bestätigen.
7. Nach 24 Stunden lesen Sie die ID-Bänder ab und registrieren Sie sie auf dem Analyseformular (Abbildung 4). (Siehe „Ablesen des Tests“.) Ein Zwischenbericht sollte zu diesem Zeitpunkt erstellt werden, wenn keine Identitätsreaktionen beobachtet werden. Positive Ergebnisse sollten dagegen sofort gemeldet werden.
8. Eine zusätzliche 48-stündige Inkubationszeit wird zur Bestätigung eines negativen Ergebnisses empfohlen. Ein endgültiger Bericht wird zum Abschluss dieser Frist erstellt.

Abbildung 4.

Well Nr.	Histoplasmin-Ablesung	Coccidioidin-Ablesung
1.	<u>Kontrollserum</u>	<u>Cocci-Kontrolle</u>
2.	<u>CARTER, R. 3287</u>	<u>NEGATIV</u>
3.	<u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIV</u>
4.	<u>Kontrollserum</u>	<u>Cocci-Kontrolle</u>
5.	<u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIV</u>
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>1 – BAND</u>
7.	<u>Antigen</u>	<u>Coccidioidin</u>
(Name, Datum, Labornr. etc.)	Nach 24 Stunden Inkubation werden die auf dem obigen Welldiagramm beobachteten Bänder eingezeichnet und die Anzahl der Bänder in die bereitstehenden Leerfelder eingetragen. HINWEIS: Die Kontrollbänder wurden auf dem obigen Welldiagramm eingezeichnet. Wenn diese Bänder nach 24 Stunden Inkubation nicht auf den Platten beobachtet werden, ist der Test nicht gültig und muss wiederholt werden.	

**ABLESEN DES TESTS**

Jede Art einer hellen, indirekten Lichtquelle kann als Sichthilfe für die Präzipitin-Bänder verwendet werden. Ein dunkler Hintergrund ist vorzuziehen. Beispielsweise kann die Platte neben den Schirm einer Hochintensitätsleuchte gehalten werden, deren Lichtstrahl gerade nach unten auf eine schwarze Tischplatte gerichtet wird. Eine helle direkte Lichtquelle kann ebenfalls verwendet werden, wenn die Platte in den Lichtstrahl in einem 45-Grad-Winkel gegen einen dunklen Hintergrund gehalten wird. Leuchtkästen, die indirektes Licht gegen einen dunklen Hintergrund bieten und besonders zum Ablesen von Immundiffusionsplatten präpariert sind, sind ebenfalls im Handel erhältlich.

Der Ausrichtung der Bänder, die vom Patientenserum in Bezug auf die Kontrollbänder produziert werden, sollte besondere Beachtung geschenkt werden. Eine glatte Kreuzung der Bänder ist ein Hinweis auf eine Identitätsreaktion. Wenn die Antikörperspiegel eines Patienten niedrig sind, erscheint u. U. nur eine leichte Beugung im Kontrollband in Richtung einer Position vor dem Patientenwell. Sollte zwischen der positiven Kontrolle und dem Antigen keine Reaktion auftreten, muss der Test wiederholt werden.

**AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE**

Ein Identitätsband mit der positiven Kontrolle zeigt einen Patienten-Antikörper gegen das in Frage stehende Pilzantigen an. Teilweise Identitätsreaktionen werden ebenfalls als Antikörper-positiv betrachtet. Nicht-Identitätsreaktionen werden als negatives Testergebnis gewertet.<sup>11</sup>

**QUALITÄTSKONTROLLE**

**Führen Sie den Test gemäß den einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durch.**

Die Qualitätskontrolle von Seiten des Verbrauchers wird bei jedem Testdurchlauf durch die Einbeziehung eines positiven Kontrollserums für jedes Antigen gewährleistet. Positive Kontrollbänder sollten nach 24 Stunden auftreten. Wenn diese Bänder nach 24 Stunden Inkubation nicht auf den Platten beobachtet werden, ist der Test nicht gültig und muss wiederholt werden. Wenn eine negative Kontrolle erwünscht ist, kann eine bekannte negative Patientenprobe als negative Kontrolle verwendet werden. Die Ergebnisse, die mit den Kontrollen erzielt werden, sollten in einem angemessenen Logbuch festgehalten werden, um qualitativ hochwertige Testungen zu gewährleisten und die Anforderungen der Aufsichtsbehörden zu erfüllen.

**Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, wiederholen Sie als Erstes zur Ermittlung der Fehlerquelle die Kontrolltests. Lassen sich auch bei wiederholten Tests die erwarteten Reaktionen nicht erzielen, rufen Sie bitte den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Vertriebspartner.**

**ERWARTETE WERTE**

In der Regel zeigt eine Identitätsreaktion gegen ein gegebenes Antigen eine aktive oder kürzlich zurückliegende Infektion an. Teilweise Identitätsreaktionen sind ebenfalls wichtige Hinweise auf wahrscheinliche Erkrankungen, insbesondere wenn keine Identitätsreaktion bei anderen Agenden beobachtet wird. Nicht-Identitätsreaktionen können auftreten, wenn der Krankheitszustand von einem anderen als dem getesteten mykotischen Agens hervorgerufen wird. Eine Nicht-Identitätsreaktion ist jedoch ein negatives Testergebnis für den in Frage stehenden Organismus.

Wenn Aktivität gegen eines der Pilzagenzien beobachtet wird, sollte ein energischer Versuch unternommen werden, den Organismus zur Bestätigung in Kultur zu demonstrieren.

**Histoplasmosse**

Die klinisch signifikanten Antigene für *H. capsulatum* werden als „H“- und „M“-Antigene bezeichnet. (Hinweis: Das „H“-Band erscheint dem Antikörperwell am nächsten, während das „M“-Band dem Antigenwell am nächsten ist.) Das „M“-Band wurde bei etwa 63 % der Patienten mit aktiver Histoplasmosse gefunden, während das „H“-Band nur bei 27 % beobachtet wurde. Das „H“-Band wird selten in Abwesenheit von Antikörpern gegen das „M“-Antigen beobachtet. Das „M“-Band kann bei Patienten auftreten, die sich kürzlich von einer Histoplasmosse erholt haben, sowie im Serum von früheren Histoplasmossepatienten, die kürzlich einer Hautuntersuchung unterzogen wurden.

Da der Test in bis zu 10 % der kulturell nachgewiesenen Fälle negativ ausfallen kann, schließt das Fehlen eines „H“- oder „M“-Bands eine Histoplasmosse nicht aus.<sup>1,21</sup>

**Coccidiomykose**

Gegen das „F“-Antigen gerichtete Antikörper sind ein Hinweis auf eine aktive oder kürzlich abgelaufene (bis zu 1 Jahr) Infektion. Der ID-Test ist normalerweise innerhalb von vier Wochen nach der Infektion positiv und bleibt im Laufe der klinisch aktiven Erkrankung positiv.

Gegen das „TP“-Antigen gerichtete Antikörper weisen auf eine neue, aktive Infektion hin. Diese Antikörper sind primär IgM-Antikörper, die innerhalb einiger Infektionstage erscheinen. Dieser ID-Test ist normalerweise innerhalb 1 Woche nach der Infektion positiv und erscheint innerhalb einiger Monate wieder als negativ.

Latex- und Komplementfixationstests können wichtige zusätzliche Informationen über den Status des Patienten liefern.<sup>4,6</sup>

Kreuzreaktionen können bei Patienten auftreten, die Wirte anderer systemischer Pilze sind (besonders *H. capsulatum*), weswegen beim Ablesen der Identitätsreaktionen besonders achtgegeben werden muss<sup>9, 18, 21</sup> (siehe **EINSCHRÄNKUNGEN**). Teilweise Identitätsreaktionen sind ebenfalls wichtige Hinweise auf wahrscheinliche Erkrankungen. Nicht-Identitätsreaktionen können auftreten, wenn der Krankheitszustand von einem anderen als dem getesteten mykotischen Agens hervorgerufen wird. Eine Nicht-Identitätsreaktion ist jedoch ein negatives Testergebnis für den in Frage stehenden Organismus.

Wenn Aktivität gegen *Coccidioides immitis* beobachtet wird, sollte ein energischer Versuch unternommen werden, den Organismus zur Bestätigung in Kultur zu demonstrieren.

**EINSCHRÄNKUNGEN**

Die hohe Rate an negativen serologischen Tests, die unter bestimmten kulturell demonstrierbaren Fällen auftritt, beschränkt den Vorhersagewert eines negativen Testergebnisses.<sup>20</sup>



**REFERENCES**

- Bauman, DS. and CD. Smith. Comparison of Immunodiffusion and complement fixation tests in the diagnosis of histoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 1975;2:77-80.
- Crowle, AJ. *Immunodiffusion*, Second Edition. Academic Press. New York. 1973; Chapters 1, 2 and 4.
- Heiner, DC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. Pediatrics 1958;22:616-627.
- Huppert, M. and JW. Bailey. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis 1. The accuracy and reproducibility of the immunodiffusion test which correlates with complement fixation. Amer. J. Clin. Path. 1965;44:364-368.
- Huppert, M. and JW. Bailey. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis 11. An immunodiffusion test as a substitute for the tube precipitin test. Amer. J. Clin. Path. 1965;44:369-373.
- Kaufman, L. Value of immunodiffusion tests in the diagnosis of systemic mycotic diseases. Ann. Clin. Lab. Sci. 1973;3:141-146.
- Kaufman, L. Practical applications of immunologic procedures for the diagnosis of opportunistic fungus infections. In: *Proceedings of the Second International Conference on Opportunistic Fungal Infections*. CC. Thomas Publishing, Springfield. 1975;pp 47-57.
- Kaufman, L. and MJ. Clark. Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion tests in the diagnosis of coccidioidomycosis. Appl. Microbiol. 1974;28:641-43.
- Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gels and the practical application of this phenomenon in the laboratory diagnosis of diphtheria. Med. Diss. Stockholm, 1949.
- Ouchterlony, O. *Handbook of Immunodiffusion and Immunolectrophoresis*. Ann Arbor Publishers Inc., Ann Arbor, 1968.
- Oudin, J. L'analyse, immunochimique qualitative. Methode par diffusion des antigenes au sein de l'immunoserum precipitant gelose. Premiere parse. Ann Inst. Pasteur 1948;75:30-52.
- Palmer, DF. et al. *Serodiagnosis of Mycotic Diseases*. CC. Thomas Publishing, Springfield. 1977;pp. 7-18.
- Pappagianis, D. Serology and Serodiagnosis of Coccidioidomycosis. In: *Coccidioidomycosis*. David A. Stearns, M.D., Editor, Plenum Publishing.
- Pappagianis, D. Immunoserologic Procedures in the Diagnosis and Management of Pulmonary Mycoses. In: *Handbook of Fungus Diseases*. H. Einstein, Editor. Amer. College of Chest Physicians. 1981.
- Pappagianis, D. Antibody in Cerebrospinal Fluid in Non-meningitic Coccidioidomycosis. Sabouraudia 1972;10:173-179.
- Pappagianis, D., NJ. Lindsey, CE. Smith, and M. Saito. Antibodies in Human Coccidioidomycosis: Immunolectrophoretic Properties. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1985;118:118-122.
- Pappagianis, D. False-positive Reactions of Cerebrospinal Fluid and Diluted Sera with the Coccidioidin Latex-agglutination Test. Am. J. Clin. Path. 1976; 66:916-921.
- Smith, CE. Coccidioidomycosis. Med. Clin. North Amer. 1943; 27:790-807.
- Smith, CE., MT. Salito, RR. Beard, KM. Kepp, RW. Clark, and BV. Eddie. Serological tests in the diagnosis of coccidioidomycosis. Am. J. Hyg. 1950;52:1-2.
- Tosh, FE. Problems in the serological diagnosis of opportunistic fungus diseases. In: *Proceedings of the Second International Conference on Opportunistic Fungal Infections*. C. C. Thomas Publishing, Springfield, 1975;pp. 36-43.
- Kaufman L. Value of immunodiffusion tests in the diagnosis of systemic mycotic diseases. Ann Clin Lab Sci 1973; 3:14146.



SN10000














REV. 09/23

 <p>Manufactured By</p>	<p><b>Meridian Bioscience, Inc.</b>  3471 River Hills Drive  Cincinnati, OHIO - 45244 USA  <a href="http://www.meridianbioscience.com">www.meridianbioscience.com</a></p> <p><u>Contacts:</u>  Main Telephone (+1) 513.271.3700  Customer Service/Orders 800.543.1980  Technical Support Center 800.343.3858  Information Fax: 513.272.5432  Ordering Fax: 513.271.0124  E-mail: <a href="mailto:info@meridianbioscience.com">info@meridianbioscience.com</a></p>
	<p><b>Meridian Bioscience Europe, SRL</b>  Via Dell'Industria 7, 20035 Villa Cortese  (Milano) ITALY  <a href="http://www.meridianbioscience.com">www.meridianbioscience.com</a></p> <p><u>Contacts:</u>  Main Telephone (+39) 0331.433636  E-mail: <a href="mailto:info@meridianbioscience.eu">info@meridianbioscience.eu</a>  Technical Support: <a href="mailto:MBE-TechService@meridianbioscience.eu">MBE-TechService@meridianbioscience.eu</a>  Customer Service/Orders:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• For Italian Customers:  <a href="mailto:ordini@meridianbioscience.com">ordini@meridianbioscience.com</a></li> <li>• For Distributors / International Customers:  <a href="mailto:Export.CustomerService@meridianbioscience.eu">Export.CustomerService@meridianbioscience.eu</a></li> </ul>

**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, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	<b>CONTROL +</b>	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
<b>LOT</b>	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / chargenbezeichnung	<b>CONTROL -</b>	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
<b>IVD</b>	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	<b>EC REP</b>	Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Meridian products carrying the European Conformity (CE) mark fulfill the requirements of Directive 98/79/EC or the Regulation 2017/746 on In-vitro diagnostic medical devices / I prodotti Meridian recanti il marchio di Conformità Europea (CE) soddisfano i requisiti della Direttiva 98/79/CE o del Regolamento 2017/746 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Les produits Meridian portant la marque de Conformité européenne (CE) sont conformes aux exigences de la Directive 98/79/CE ou du Règlement 2017/746 relatifs aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Los productos de Meridian que llevan la marca de conformidad europea (CE) cumplen los requisitos de la Directiva 98/79/CE o del Reglamento 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Produkte von Meridian mit der CE-Kennzeichnung erfüllen die Anforderungen der EU-Richtlinie 98/79/EG bzw. der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika	<b>SMP PREP DIL SPE</b>	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
			CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligroso / WARNUNG: Risikogefahr
<b>REF</b>	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Eingrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	<b>BUF RXN</b>	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" test / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	<b>SOLN STOP</b>	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	<b>CONJ ENZ</b>	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / enzymkonjugat
<b>SN</b>	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	<b>CONTROL</b>	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
<b>TEST</b>	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgerät	<b>REAG</b>	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	<b>BUF WASH</b>	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
<b>BUF</b>	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
<b>CONJ</b>	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	<b>DIL SPE</b>	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
<b>SUBS</b>	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	<b>BUF WASH 20X</b>	Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione dil lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
<b>Rx Only</b>	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	<b>DET REAG</b>	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete esta dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	<b>TUBE</b>	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß
	Single Use Only / Prodotto Monouso / A usage unique / Para Un Solo Uso / nur für die einmalige Anwendung	<b>CH REP</b>	Swiss Authorized Representative / Mandatario svizzero / Mandataire Suisse / Representante Autorizado Suizo / Schweizer Bevollmächtigter

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.