

Fungal Immunodiffusion System

REF 100201, 100601

IVD In vitro diagnostic medical device

Rx Only

INTENDED USE

The Meridian Bioscience Fungal Immunodiffusion Reagents are standardized, purified preparations for the *in vitro* determination of precipitating antibodies to two systemic fungal pathogens: *Histoplasma capsulatum* (*H. cap.*) and *Coccidioides immitis* (*C. imm.*). These reagents are optimized for use in the Ouchterlony double diffusion method.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

H. cap. and *C. imm.* 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 tuberculous lesions, neoplasms, cancerous tissue and each other. Symptoms are often unremarkable and may mimic various pneumonias, sarcoidosis, cancer and other maladies. Culturally and histologically the organisms may be difficult to demonstrate even after repeated attempts.³⁻⁵

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.¹¹

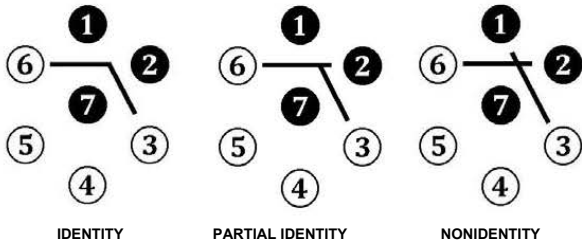
The fungal immunodiffusion test is a simple and reliable tool for the evaluation of suspected mycoses. Anticomplementary sera may be tested using this technique. The test also provides specificity data on reactions obtained by the complement fixation method. No expensive equipment is required and the technique is simple enough to be performed by any laboratory, thus providing an excellent screening method.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The Meridian Bioscience Fungal Immunodiffusion System is 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 antibody well, to antibody excess closest to the antigen well. A visible line of precipitate forms at the point of equivalence.⁹⁻¹⁰

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 1)

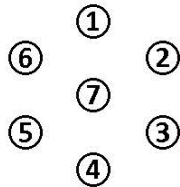
Figure 1



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.

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 2)

Figure 2: Arrangements of Sera and Antigens in Immunodiffusion Well Pattern.



Positive control serum, wells 1 & 4; Patient sera, wells 2, 3, 5, & 6; Antigen, well 7.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

A. **Antigens.** The following antigens are available in a 0.2 mL size as a part of the Fungal Immunodiffusion System (Catalog #100201, 100601) or separately in a 1.0 mL size. Coccidioidin antigen is also available in a 5.0 mL size.

- Histoplasmin. A purified mycelia cultural filtrate from the growth of *Histoplasma capsulatum* containing the "H" and "M" antigens. 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. A purified cultural filtrate containing the "F" antigen of *Coccidioides immitis* at a concentration of 100 units/mL*.

These antigens contain thimerosal at a final concentration of 0.01% as a preservative. Care should be exercised, however, to avoid microbial contamination.

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

B. **Control Sera.** The following lyophilized control sera are provided in 0.4 mL size as a part of the Fungal Immunodiffusion System or are available separately in the 1.0 mL size. All control sera are raised in hyper-immune (not infected) goats against purified antigen preparations.

- Histoplasmosis positive control. 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 positive control. Contains specific antibodies directed against the "F" antigen of *C. immitis*.

These positive control sera are preserved with 0.1% sodium azide. Nevertheless, care should be exercised to avoid microbial contamination.

NOTE: Due to the standardization necessary to the production of high quality fungal serology reagents, performance of 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 modifications to the procedures published herein.

MATERIALS NOT PROVIDED

- 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. Darkfield 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 to almost any bright indirect light source for adequate visualization.
- Immunodiffusion plates (Meridian Catalog Number 101009).

PRECAUTIONS

- All reagents are for *in vitro* diagnostic use only.
- When handling blood specimens, adequate measures should be taken to prevent the dissemination of etiologic 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

Refer to the SDS, available at www.meridianbioscience.com for Hazards and Precautionary Statements.

SHELF LIFE AND STORAGE

Fungal antigens are best stored at refrigerator temperature 2-8 C. Repeated freezing and thawing is detrimental to these antigens. When stored at 2-8 C the antigens are stable until the expiration as indicated on each bottle.

Positive control sera are stable in the lyophilized state until the expiration as indicated on each bottle when stored at 2-8 C. Once reconstituted it is suggested that they be aliquotted and frozen if they will not be consumed within one month. 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.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

For optimal results, sterile serum is obtained from the blood of a patient. If a failure 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 0.01% thimerosal or 0.1% sodium azide if necessary.

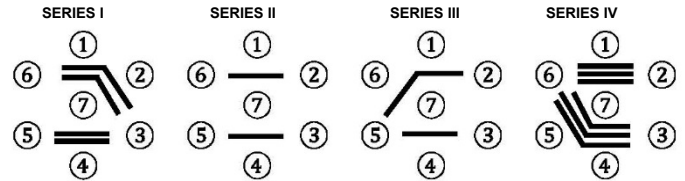
TEST PROCEDURE

- Reconstitution of positive control sera**
 - Using a 1.0 mL pipet or tuberculin syringe add 0.38 mL (for 0.4 mL vials) or 0.95 mL (for 1.0 mL vials) 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 one hour, occasionally inverting to mix. (Do not shake)
 - If, upon its first use, the serum appears inactive, it may be that sufficient standing time was not allowed. In this case repeat the test.
 - Aliquot and freeze any control serum which will not be consumed within one month. (See **SHELF LIFE AND STORAGE**)
- Test Procedure**
 - Please refer to figures 2, 3 and 4 for proper designation of the test well patterns.
 - Using the provided capillary pipets (Fungal Immunodiffusion System only), fill the control serum wells of an ID plate with the appropriate control sera as follows:
 - Histoplasma* control serum - Series I, wells 1 & 4.
 - Coccidioides* control serum - Series III, wells 1 & 4.

Figure 3

FUNGAL IMMUNODIFFUSION ANALYSIS (SAMPLE FORM)

Plate No. 5 Date 12-5-01



- Record the name, date, and/or lab number of the first patient on line two of the left hand column (Figure 4) of the recording form and, using a capillary tube, fill the well two of each of series I, II, III and IV with the patient's serum. Using a fresh capillary tube for each patient, repeat this procedure for additional sera in wells three, five and six of each series.
- Using a fresh capillary tube, fill the center well or series I with Histoplasmin antigen and Coccidioidin antigen (series III).
- 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 six hours for some antigens. It will still be necessary to confirm the results of the other antigens 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.

Figure 4

Well Number	SERIES I (Histoplasmin) Reading	SERIES III (Coccidioidin) Reading
1.	<u>Control Serum</u>	<u>Histo Control</u>
2.	<u>CARTER, R. 3287</u>	<u>H and M BANDS</u>
3.	<u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIVE</u>
4.	<u>Control Serum</u>	<u>Histo Control</u>
5.	<u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIVE</u>
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>NEGATIVE</u>
7.	<u>Antigen</u>	<u>Coccidioidin</u>
(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.	

- An additional 48 hour incubation period is recommended to confirm a negative result with any reagent. A final report is made at the conclusion of this period.

INTERPRETATION OF RESULTS

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, 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 is indicative of an identity reaction. If the control band is seen to bend toward a position in front of the patient well, it is indicative of patient antibody at a low titer.

Should no reaction be observed between the positive control and the antigen the test must be repeated.

Such reactions may be tested by flooding with 1 M sodium citrate for five minutes. Reactions which disappear after this treatment are due to C reactive protein and may be disregarded.

INTERPRETATION

A band of identity with a known positive control is indicative of patient antibody against the antigen in question. Partial identity reactions are regarded as positive for antibody against the antigen only if no other identity reaction is present on the plate. Non-identity reactions are regarded as a negative test.¹¹

REPORTING OF TEST RESULTS

If identity or partial identity reactions are observed the test may be reported as "Positive for antibodies to (name of antigen)" or "Identity reaction with (name of antigen)". Non-identity reactions and sera which are unreactive may be reported as "Negative for antibodies to (name of antigen) by immunodiffusion".

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. A negative control may usually be found among the various patients tested.

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 Services 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 observed 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. cap* 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.^{1, 5}

Coccidioidomycosis

Antibodies directed against the "F" antigen are indicative of active or recent past (up to one year) infection. The ID test is usually positive within four weeks after infection and remains positive throughout the clinically active disease. Latex and complement fixation testing may provide important additional information regarding patient status.⁴

Cross-reactions may be seen in patients harboring other systemic fungi (especially *H. cap*.) so care must be exercised when reading for identity reactions.^{7, 11, 13}

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The high rate of negative serologic tests observed among culturally demonstrable cases limits the predictive value of a negative test.

ITALIANO

Fungal Immunodiffusion System

REF 100201, 100601

IVD Dispositivo medico-diagnostico in vitro

Rx Only

FINALITÀ D'USO

I reagenti per l'immunodiffusione fungina Meridian Bioscience sono soluzioni standardizzate purificate per la determinazione *in vitro* degli anticorpi di precipitazione di due patogeni fungini sistemici: *Histoplasma capsulatum* (*H. cap.*) e *Coccidioides immitis* (*C. imm.*). Questi reagenti sono adatti per essere utilizzati con il metodo di Ouchterlony o immunodiffusione doppia.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

H. cap. e *C. imm.* sono gli agenti responsabili delle micosi profonde. Questi funghi rappresentano una sfida a livello diagnostico per i medici e i tecnici di laboratorio di microbiologia.

Mediante la radiografia potrebbe essere difficile individuare i vari tipi di lesioni provocate dai funghi sistemici e distinguerle da quelle causate dalla tubercolosi, dai neoplasmi e dai tessuti cancerosi. I sintomi spesso non vengono riconosciuti e talvolta possono essere confusi con gli stessi provocati da polmonite, sarcoidosi, cancro e altre malattie. A livello culturale e istologico è difficile rilevare la presenza di questi organismi, anche dopo ripetuti tentativi.^{3, 5}

Spesso la sierologia offre l'unica prova in grado di guidare le terapie, suggerire prognosi o condurre alla selezione di tecniche diagnostiche precise, ad esempio la biopsia o la coltura intensiva. Inoltre, le procedure di sierologia quantitativa, come ad esempio il test di fissazione del complemento, sono in grado di fornire importanti informazioni relative agli effetti della chemioterapia.¹¹

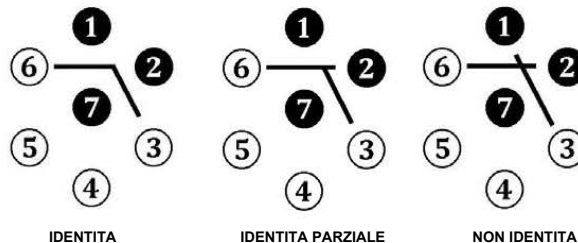
Il test di immunodiffusione fungina è uno strumento semplice e affidabile per la diagnosi di sospette micosi. Con questa tecnica è possibile eseguire i test sui sieri anticomplementari. Il test fornisce inoltre dati specifici sulle reazioni ottenute con il metodo di fissazione del complemento. Non è necessario disporre di apparecchiature costose e le procedure sono talmente semplici da potere essere eseguite presso qualsiasi laboratorio e per tale ragione rappresentano un eccellente metodo di screening.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il sistema di immunodiffusione fungina Meridian Bioscience si basa sul principio della doppia diffusione, come descritto da Oudin e Ouchterlony. Un anticorpo e il relativo antigene solubile omologo vengono situati in pozzetti separati, diluiti in un mezzo di coltura di diffusione dell'agarosio e lasciati diffondere all'esterno. Fra i due pozzetti viene stabilito un gradiente di concentrazione di ciascuno dei componenti di reazione che varia dal valore eccedente dell'antigene più vicino al pozzetto dell'anticorpo al valore eccedente dell'anticorpo più vicino al pozzetto dell'antigene. Nel punto di equivalenza si forma una linea visibile di precipitati.^{8, 9, 10}

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. Si i composti dell'antigene o dell'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 la figura 1).

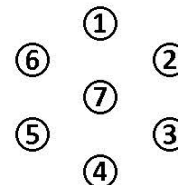
Figura 1



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

Le strutture del pozzetto delle piastre di immunodiffusione Meridian sono tali da fornire il pozzetto di prova di ciascun paziente con un sistema di riferimento noto, in modo che le reazioni di identità siano chiaramente leggibili (vedere la figura 2).

Figura 2. Disposizione di sieri e antigeni nella struttura del pozzetto di immunodiffusione.



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

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

A. **Antigeni:** i seguenti antigeni sono disponibili nel formato da 0,2 mL come parte del sistema di immunodiffusione fungino (N. catalogo 100201, 100601) o da 1,0 mL se presi separatamente. L'antigene coccidioidina è disponibile anche nel formato da 5,0 mL.

- Istoplasmina: filtrato culturale miceliale purificato risultante dalla crescita dell'*Histoplasma capsulatum* contenente gli antigeni "H" e "M". Il preparato contiene 100 unità/mL* di ogni antigene. I lipidi, i componenti del mezzo e la maggior parte degli altri componenti antigenici sono stati rimossi. (Nota: la banda più vicina al pozzetto dell'anticorpo è la banda "H", mentre la banda "M" è quella più vicina al pozzetto dell'antigene.)
- Coccidioidina: filtrato culturale purificato contenente l'antigene "F" del *Coccidioides immitis* a una concentrazione di 100 unità/mL*.

Gli antigeni contengono timerosal a una concentrazione finale pari a 0,01% come conservante. Si consiglia tuttavia di prestare particolare attenzione al fine di evitare contaminazioni da microbi.

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

B. **Sieri di controllo:** i seguenti sieri di controllo liofilizzati vengono forniti nel formato da 0,4 mL come parte del sistema di immunodiffusione fungino o da 1,0 mL se presi separatamente. Tutti i sieri di controllo vengono coltivati in capre iperimmuni, ovvero non infette, contro preparati di antigeni purificati.

- Controllo positivo dell'istoplasmosi: contiene anticorpi specifici diretti contro gli antigeni "H" e "M" di *H. capsulatum*. (Nota: la banda più vicina al pozzetto dell'anticorpo è la banda "H", mentre la banda "M" è quella più vicina al pozzetto dell'antigene.)
- Controllo positivo della coccidioidomycosi: contiene anticorpi specifici diretti contro l'antigene "F" di *C. immitis*.

Questi sieri di controllo positivo vengono conservati con azotidrato di sodio allo 0,1%. Ciononostante, si consiglia di prestare particolare attenzione al fine di evitare contaminazioni da microbi.

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 NON FORNITI

- Acqua reagente.
- Camera umida: è possibile utilizzare qualsiasi contenitore, ad esempio, 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 rimangono idratate durante l'incubazione.
- Luce da lettura. In commercio sono disponibili lettori con piastre a campo scuro; tuttavia è possibile elaborare un sistema soddisfacente utilizzando una lampada ad alta intensità in cui il riflettore dello schermo della lampadina sia coperto 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.
- Piastre di immunodiffusione (Meridian Catalog Number 101009)

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Quando si maneggiano campioni di sangue è necessario adottare adeguate misure di sicurezza per evitare la disseminazione degli agenti eziologici potenzialmente presenti nei campioni.
- I sieri di controllo vengono conservati con azotidrato di sodio. L'accumulo di questa sostanza chimica 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 sciaccquare abbondantemente.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

Fare riferimento alla SDS, disponibile sul sito www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) per i rischi e i consigli di prudenza.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Gli antigeni fungini vanno conservati a una temperatura di 2-8°C. Congelare e scongelare ripetutamente gli antigeni è dannoso per gli antigeni stessi. Se conservati a 2-8°C, gli antigeni rimangono stabili fino alla data di scadenza indicata su ogni bottiglia.

I sieri di controllo rimangono stabili allo stato liofilizzato fino alla data di scadenza indicata su ogni bottiglia se conservati alla temperatura di 2-8°C. Una volta ricostituiti, se non si prevede di utilizzarli entro un mese, si consiglia di frazionarli e congelarli. Se conservati a una temperatura pari a -20°C si mantengono per almeno nove mesi. Si consiglia di evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Durante l'utilizzo dei sieri di controllo positivo, tenerli a temperatura ambiente il meno possibile.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per ottenere risultati ottimali, il siero sterile deve essere prelevato dal sangue dei pazienti. Se si ritarda l'elaborazione dei campioni, è possibile congelarli per 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 timerosal allo 0,01% o con azotidrato di sodio allo 0,1%.

PROCEDURA DEL TEST

A. Ricostituzione del siero di controllo positivo

- Utilizzando una pipetta da 1,0 mL o una siringa da tuberculina, aggiungere alle fiale del siero di controllo 0,38 mL (per fiale da 0,4 mL) o 0,95 mL (per fiale da 1,0 mL) di acqua reagent.
- Esercitare un leggero colpo sul fondo delle fiale per mescolare il contenuto.
- Lasciare le fiale per circa un'ora a temperatura ambiente capovolgendole di tanto in tanto per mescolarne il contenuto (senza agitare).
- Se al primo utilizzo il siero non è attivo, il periodo di posa potrebbe non essere stato sufficiente. In questo caso, ripetere il test.
- Frazionare e congelare il siero di controllo che non verrà utilizzato per più di un mese (Vedere **STABILITÀ E CONSERVAZIONE**).

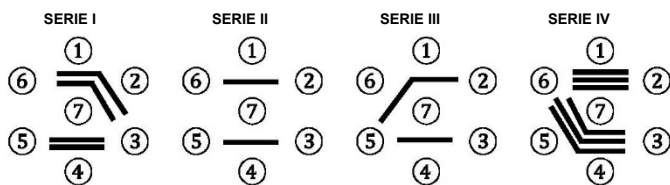
B. Procedura del test

- Per la corretta assegnazione della struttura del pozzetto di prova, vedere le figure 2, 3 e 4.
- Utilizzando le pipette capillari fornite (solo per il sistema di immunodiffusione fungina), riempire i pozzetti di una piastra ID con i seguenti sieri di controllo:
 - Siero di controllo *Histoplasma* – Serie I, pozzetti 1 e 4
 - Siero di controllo *Coccidioides* – Serie III, pozzetti 1 e 4

Figura 3

ANALISI DI IMMUNODIFFUSIONE FUNGINA (MODULO DI ESEMPIO)

Plate No. 5 Date 12-5-01



- 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 due delle serie I, II, III e IV con il siero del paziente, utilizzando un tubo capillare. Ripetere questa procedura per ulteriori sieri nei pozzetti tre, cinque e sei di ciascuna serie, utilizzando un tubo capillare nuovo per ogni paziente.
- Utilizzando un tubo capillare nuovo, riempire il pozzetto centrale della serie I con l'antigene istoplasmina e coccidioidina (serie III).
- Numerare e datare la piastra ID e il modulo di analisi.
- Inserire la piastra ID in una camera umida e incubare a temperatura ambiente per 24 ore. **NOTA:** per alcuni antigeni, le bande sono visibili già dopo sei ore; tuttavia sarà necessario confermare i risultati degli altri antigeni successivamente.
- Trascorse 24 ore, leggere e registrare le bande ID nel modulo di analisi (figura 4) vedere **Letture 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.

Figura 4

N. Pozzetto	SERIE I (Istoplasmina) Lettura	SERIE III (Coccidioidina) Lettura	
1.	<u>Siero di Controllo</u>	<u>Contr Ist</u>	<u>Contr Cocci</u>
2.	<u>CARTER, R. 3287</u>	<u>BANDE H e M</u>	<u>NEGATIVO</u>
3.	<u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>
4.	<u>Siero de Controllo</u>	<u>Contr Ist</u>	<u>Contr Cocci</u>
5.	<u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>NEGATIVO</u>	<u>NEGATIVO</u>
7.	<u>Antigene</u>	<u>Istoplasmina</u>	<u>Coccidioidina</u>
(Nome, Data, N. Lab, etc.)	Trascorse 24 ore di incubazione, disegnare le bande osservate nel diagramma dei pozzetti sopra riportato e registrare il numero di bande negli spazi presenti. 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.		

- Prima di confermare un risultato negativo con un qualsiasi reagente, si consiglia di prolungare il periodo di incubazione di altre 48 ore. Il rapporto finale viene redatto al termine di questo periodo.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

LETTURA DEL TEST

Per visualizzare al meglio le bande di precipitazione, 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 specificamente 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 di anticorpi del paziente, nella banda di controllo potrebbe apparire solo una lieve banda in prossimità di una posizione situata di fronte al pozzetto del paziente.

Se non vengono osservate reazioni fra il controllo positivo e l'antigene, il test deve essere ripetuto.

Questa reazione può essere testata aggiungendo 1 M di citrato di sodio per cinque minuti. Le reazioni che scompaiono dopo questo trattamento sono dovute alla proteina reattiva C e possono essere ignorate.

INTERPRETAZIONE

Una banda di identità con controllo positivo indica l'anticorpo del paziente contro l'antigene in questione. Reazioni di identità parziale sono considerate positive per l'anticorpo nei confronti dell'antigene solo se nella piastra non è presente nessuna altra reazione di identità. Reazioni di non identità sono considerate test negativi.¹¹

RAPPORTO DEI RISULTATI DEL TEST

Se si osservano reazioni di identità o di identità parziale, il test può essere riferito come "Positivo per gli anticorpi di (nome dell'antigene)" o "Reazione di identità a (nome dell'antigene)". Le reazioni di non identità e i sieri non reattivi possono essere riferiti come "Negativo per gli anticorpi di (nome dell'antigene) tramite immunodiffusione".

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. Fra i vari pazienti sottoposti al test, potrebbe essere rilevato un controllo negativo.

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, (Italia +390331433636).

VALORI ATTESI

In genere, una reazione di identità nei confronti di un dato antigene indica la presenza di infezioni attive o recenti. Anche le reazioni di identità parziali sono importanti indicatori di probabili patologie, specialmente se non si sono osservate reazioni di identità fra altri agenti. Le reazioni di non identità potrebbero essere visibili se lo stato patologico è causato da un agente micotico diverso da quello testato. Una reazione di non identità, tuttavia, è un test negativo per l'organismo in questione.

Se viene osservata l'attività nei confronti di un agente fungino, si consiglia di confermare l'esistenza dell'organismo con una coltura.

Istoplasmosi

Gli antigeni significativi dal punto di vista clinico per *H. Cap.* sono definiti antigeni "H" e "M" (Nota: la banda "H" appare più vicina al pozzetto dell'anticorpo, mentre quella "M" è più vicina a quello dell'antigene). La banda "M" è stata riscontrata in circa il 63% dei pazienti con istoplasmosi attiva, mentre la banda "H" è presente solo nei restante 27%. La banda "H" viene raramente osservata in assenza di anticorpi nei confronti dell'antigene "M". La banda "M" può essere presente in pazienti convalescenti da istoplasmosi e nel siero di pazienti con istoplasmosi progressiva, a cui è stato di recente effettuato il test della cute.

Dato che il test potrebbe risultare negativo quasi nel 10% dei casi verificati con coltura, l'assenza di una banda "H" o "M" non esclude completamente l'istoplasmosi.^{1,5}

Coccidioidomicosi

La presenza di anticorpi dell'antigene "F" indicano la presenza di infezioni attive o recenti (fino a un anno). Il test ID risulta in genere positivo fino a quattro settimane in seguito all'infezione e rimane tale per tutto il corso della malattia. Il test di fissazione del componente e la prova al lattice possono fornire ulteriori importanti informazioni in merito allo stato del paziente.⁴

È possibile rilevare la presenza di reazioni incrociate in pazienti affetti da altri funghi sistemici, in particolare da *H. cap.*, pertanto è necessario prestare particolare attenzione durante la lettura delle reazioni di identità.^{7, 11, 13}

LIMIT AZIONI DELLA PROCEDURA

L'alta percentuale di test sierologici negativi osservati fra determinati casi dimostrabili con la coltura limita il valore predittivo di un test negativo.

FRANÇAIS

Fungal Immunodiffusion System

REF 100201, 100601

IVD

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Les réactifs d'immunodiffusion fongique de Meridian Bioscience sont des préparations purifiées pour la détermination *in vitro* d'anticorps précipitants de deux agents pathogènes fongiques systémiques: *Histoplasma capsulatum* (*H. cap.*) et *Coccidioides immitis* (*C. imm.*). Ces agents sont optimisés pour être utilisés avec la méthode d'Ouchterlony.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

H. cap et *C. imm.* sont des agents pathogènes de mycose profonde. Ces mycoses présentent un défi diagnostique pour le laboratoire de microbiologie et le médecin.

Radiographiquement, les lésions produites par les mycoses profondes sont difficilement discernables des lésions tuberculeuses, néoplasmiennes, des tissus cancéreux et d'autres maladies. Les symptômes sont souvent indiscernables et peuvent ressembler à diverses pneumonies, sarcoïdoses, cancers et autres maladies. Les organismes sont difficiles à démontrer, aussi bien en culture qu'en histologie, et ce même après plusieurs tentatives.^{3,5}

Fréquemment la sérologie est le seul moyen d'orienter le traitement, de suggérer un pronostic ou d'aboutir à la sélection d'autres techniques de diagnostic comme la culture intensive ou la biopsie. En outre, la sérologie quantitative, telle que le test de fixation du complément, peut offrir des informations importantes sur les effets de la chimiothérapie.¹¹

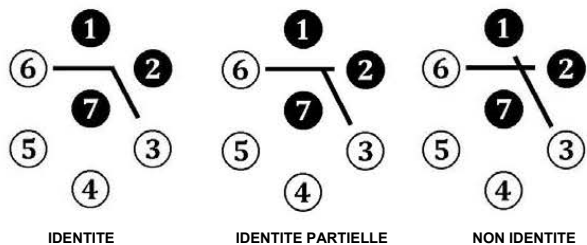
Le test d'immunodiffusion fongique est un outil simple et fiable pour l'évaluation d'éventuelles mycoses. Des sérums anticorpiques peuvent être testés à l'aide de ces techniques. Ce test offre également des données spécifiques sur les réactions obtenues par la méthode de fixation du complément. Il n'est pas nécessaire d'avoir des équipements onéreux et la technique est assez simple pour être réalisée par n'importe quel laboratoire, ce qui se traduit par une excellente méthode d'examen.

PRINCIPE DU TEST

Le système d'immunodiffusion fongique de Meridian Bioscience est basé sur le principe de la double diffusion telle qu'elle est décrite par Oudin et Ouchterlony. Un anticorps et son antigène homologue soluble sont placés dans des puits séparés creusés dans un milieu de diffusion à l'agarose, puis laissés à diffuser. Entre les deux puits, un gradient de concentration de chaque composant de réaction est établi, qui varie entre l'excès d'antigène le plus proche du puits d'anticorps à l'excès d'anticorps le plus proche du puits d'antigène. Une ligne visible de précipitation se forme au point d'équivalence.^{8,10}

Les antigènes et anticorps peuvent être testés pour "identité" en plaçant un puits de test de la substance en question adjacente aux puits d'un système connu. Si les complexes antigéniques – anticorps sont identiques, les lignes de précipitation forment une ligne d'identité continue avec le système connu. Les réactions d'identité partielle et de non identité sont également possible (voir Figure 1).

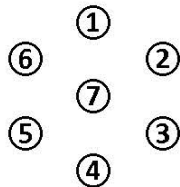
Figure 1.



Une réaction d'identité partielle survient quand certains composants d'antigènes (ou anticorps) sont identiques et d'autres ne le sont pas. L'«éperon» représente les composants étant sans rapport. Une réaction de non identité survient quand les complexes antigène – anticorps sont différents. Le «X» résultant ou la réaction croisée indique la présence de deux complexes sans rapport.

La disposition des puits sur la plaque d'immunodiffusion Meridian est telle que chaque puits de test d'un patient est associé à un système de référence connu, de sorte que les réactions d'identité apparaissent clairement.

Figure 2. Disposition des sérums et antigènes sur une plaqué d'immunodiffusion.



Sérum de contrôle positif, puits 1 et 4; sérums de patient, puits 2, 3, 5, et 6; antigènes, puits 7.

MATERIEL FOURNI

Le nombre maximal de tests pouvant être réalisés à partir de ce coffret est indiqué sur la boîte.

A. **Antigènes:** Les antigènes ci-après sont disponibles en volume de 0,2 mL dans le système d'immunodiffusion fongique (catalogue No. 100201, 100601) ou séparément en volume de 1,0 mL. Les antigènes coccidioidine sont également disponibles en volume de 5,0 mL.

1. Histoplasmine. Filtrat de culture mycélienne issu de la croissance de *Histoplasma capsulatum* contenant les antigènes "H" et "M". La préparation contient 100 unités/mL* de chaque antigène. Les lipides, composants du milieu, et la plupart des composants antigéniques ont été retirés. (Remarque: la bande "H" apparaît la plus proche du puits d'anticorps tandis que la bande "M" est la plus proche du puits antigène.)
2. Coccidioidine. Un filtrat de culture purifié contenant l'antigène "F" de *Coccidioides immitis* à une concentration de 100 unités/mL*.

Ces antigènes contiennent du thimérosal (comme conservateur) à une concentration finale de 0,01%. Il est recommandé de faire extrêmement attention de manière à éviter toute contamination microbienne.

* Ces unités sont des normes internes de Meridian et sont exclusivement destinées à assurer la reproductibilité de la concentration en antigènes d'un lot à un autre.

B. **Sérums de contrôle.** Le contrôle lyophilisé ci-après est d'un volume de 0,4 mL et fait partie du système d'immunodiffusion fongique; il est également disponible séparément du système en volume de 1,0 mL. Tous les sérums de contrôle sont élevés dans des chèvres hyper-immunes (non infectées) contre des préparations antigéniques purifiées.

1. Contrôle histoplasme positif. Contient des anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes "H" et "M" de *H. capsulatum*. (Remarque: la bande "H" apparaît la plus proche du puits d'anticorps tandis que la bande "M" est la plus proche du puits antigène.)
2. Contrôle Coccidioidomycoose positif. Contient des anticorps dirigés contre l'antigène "F" de *C. immitis*.

Ces sérums de contrôle positifs sont préservés avec de l'azide de sodium à 0,1%. Il est toutefois recommandé de faire extrêmement attention de manière à éviter toute contamination microbienne.

REMARQUE: Dû à la nécessaire standardisation pour la production de réactifs de sérologie fongiques de haute qualité, les performances des antigènes, des sérums de contrôle et des plaques avec des matières autres que celles produites par Meridian Bioscience, Inc. ne peuvent pas être garanties. L'utilisateur assumera l'entière responsabilité en cas de modifications apportées aux procédures décrites dans ce document.

MATERIEL NON FOURNI

1. Eau de réactif de qualité.
2. Chambre humide. Tout récipient adéquat, telle que boîte de Pétri, boîte en plastique ou cylindre en verre doté d'une fermeture étanche incluant du papier-filtre humide ou une serviette en papier humide, convient dans la mesure où les plaques d'ID sont stationnaires, à niveau et continuellement hydratées lors de l'incubation.
3. Lampe de lecture. Des lecteurs de plaque à fond obscur sont en vente dans le commerce, néanmoins un système satisfaisant peut être conçu en utilisant une lampe à forte intensité dont la partie avant du réflecteur de blindage de l'ampoule est couvert de papier d'ouvrage doté d'un petit trou (1-2 cm de diamètre) pour éclairage. On peut également tenir la plaque à un angle de 45 degrés devant toute source de lumière vive indirecte.
4. Plaque d'immunodiffusion (Meridian Catalog Number 101009)

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Lors de la manipulation des échantillons de sang, les mesures appropriées doivent être prises afin d'éviter la dissémination d'agents étiologiques potentiellement présents dans les échantillons.
3. Les sérums de contrôle sont conservés avec de l'azide de sodium. L'accumulation de ce produit chimique dans les pièces fixes en plomb présente un risque d'explosion. Il est donc recommandé d'éliminer l'excès de sérum de contrôle dans un récipient pour déchet approprié ou simplement de l'évacuer dans une conduite avec un large volume d'eau.

DANGER ET MISES EN GARDE

Pour les dangers et les précautions à prendre, se référer à la fiche de sécurité, disponible sur le site web de Meridian Bioscience. ([www.meridianbioscience.com] (US version) / [www.meridianbioscience.eu] (EU version)).

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Le meilleur moyen de stocker les antigènes fongiques est de les conserver à température de réfrigérateur (2 à 8°C). Les congélation et décongélation sont nuisibles à ces antigènes. Conservés de 2 à 8°C, ils sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur la bouteille.

Les sérums de contrôle positif sont stables en état lyophilisé et stockés de 2 à 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur chaque bouteille. Une fois reconstitués, il est suggéré de les partager et de les congeler s'ils ne sont pas consommés dans un délai d'un mois. À -20°C, on peut espérer une durée de vie minimum de neuf mois. Il faut absolument éviter la congélation et décongélation à répétition. Quand les sérums de contrôle positif sont utilisés, il est recommandé de les garder un minimum de temps à température ambiante.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Pour l'obtention de résultats optimaux, le sérum stérile est obtenu à partir du sang du patient. En cas de délai du traitement de l'échantillon, la réfrigération est autorisée jusqu'à 72 heures. Les échantillons peuvent être stockés jusqu'à six mois à -20°C sans aucune perte d'activité, à supposer qu'ils n'ont pas été congelés et décongelés plusieurs fois. Les échantillons en transit entre laboratoire doivent être maintenus de 2 à 8°C pour des résultats optimaux. Si besoin est, les échantillons peuvent être conservés avec du thimérosal à 0,01% ou de l'azide de sodium à 0,1%.

PROCEDURE DE TEST

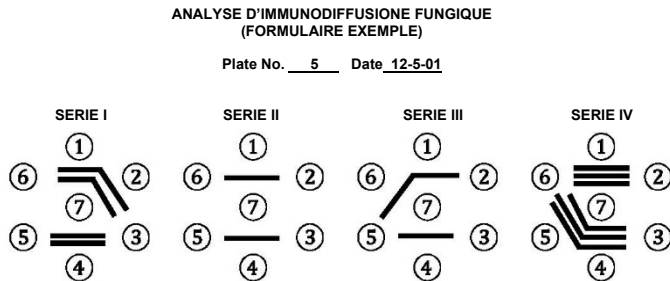
A. **Reconstitution des sérums de contrôle positif.**

1. À l'aide d'une pipette de 1,0 mL ou d'une seringue tuberculine, ajouter 0,38 mL (pour des fioles de 0,4 mL) ou 0,95 mL (pour des fioles de 1,0 mL) d'eau de réactif aux fioles de sérum de contrôle.
2. Secouer très doucement le fond des fioles pour mélanger.
3. Laisser la fiole en position verticale pendant environ une heure en inversant de temps à autre pour mélanger. (Ne pas agiter.)
4. Si, lors de la première utilisation, le sérum apparaît inactif, la durée en position verticale a probablement été insuffisante. Répéter le test.
5. Subdiviser et congeler le sérum de contrôle qui ne sera pas utilisé dans le mois. (voir **DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE**.)

B. **Procédure de test**

1. Se référer aux figures 2, 3 et 4 pour identifier la configuration des puits.
2. À l'aide de pipettes capillaires (Système d'immunodiffusion fongique exclusivement), remplir les puits de sérum d'une plaque d'ID avec les sérums de contrôle appropriés ci-après:
 - a. Sérum de contrôle *Histoplasma*; Série I, puits 1 & 4
 - b. Sérum de contrôle *Coccidioides*; Série III, puits 1 & 4

Figure 3



3. Enregistrer le nom, la date et/ou le numéro de laboratoire du premier patient sur la ligne deux de la colonne de gauche (Figure 4) du formulaire d'enregistrement et à l'aide d'un tube capillaire, remplir les puits deux de chaque série I, II, III et IV avec le sérum du patient. À l'aide d'un tube capillaire propre pour chaque patient, répéter cette procédure pour d'autres sérums dans les puits trois, cinq et six de chaque série.
4. À l'aide d'un tube capillaire, remplir le puits central de la série I avec l'antigène Histoplasmine et l'antigène Coccidioidine (série III).
5. Numéroté et dater la plaque d'ID et le formulaire d'analyse.
6. Placer la plaque d'ID dans une chambre humide et incubé à température ambiante pendant 24 heures. **REMARQUE:** Les bandes peuvent être évidentes à partir de six heures pour certains antigènes II est néanmoins nécessaire de confirmer ultérieurement les résultats des autres antigènes.
7. Après 24 heures, lire et enregistrer les bandes d'ID sur le formulaire d'analyse (Figure 4). (voir **Lecture des tests**.) Un rapport temporaire doit être établi à ce stade si aucune réaction d'identité n'est observée. Les résultats positifs doivent être immédiatement déclarés.

Figure 4

No. de Puits	SÉRIE I (Histoplasmine) Lecture	SÉRIE III (Coccidioidine) Lecture
1.	Sérum de Contrôle	Cont. Hysto
2.	CARTER, R. 3287	BANDES H et M
3.	LESTER, C. 2519	NEGATIF
4.	Sérum de Contrôle	Cont. Hysto
5.	BARNES, T. 1362	NEGATIF
6.	HASKAMP, D. 1154	NEGATIF
7.	Antigène	Coccidioidine

(Nom, Date, No. Lab, etc.)

Après 24 heures d'incubation, tracer les bandes observées sur le diagramme de puits ci-dessus et enregistrer le nombre de bandes dans l'emplacement approprié.

Remarque: Les bandes de contrôle ont été tracées sur le diagramme ci-dessus. Si ces bandes ne sont pas observées sur les plaques, le test n'est pas valide et doit être répété.

8. Une période d'incubation supplémentaire de 48 heures est recommandée pour confirmer un résultat négatif avec un réactif. Un rapport final est établi après la conclusion de cette période.

INTERPRÉTATION DES RESULTATS

LECTURE DES TESTS

Toute source de lumière vive indirecte peut être utilisée pour aider à lire les bandes de précipité. Il est préférable d'utiliser un fond sombre. Par exemple, la plaque peut être tenue à côté de l'abat-jour d'une lampe à forte intensité dont le faisceau lumineux est dirigé directement vers le bas, sur une surface sombre.

Une source de lumière vive directe peut être également utilisée si la plaque est tenue dans le faisceau lumineux à un angle de 45 degrés sur un fond sombre.

Des boîtes à lumière, fournissant une lumière indirecte sur fond sombre pour la lecture de plaques d'immunodiffusion, sont également disponibles dans le commerce.

Une attention toute particulière doit être portée à l'orientation des bandes produites par le sérum de patient en relation avec les bandes de contrôle. Une nette jonction entre les bandes indique la présence d'une réaction d'identité. Si la bande de contrôle inflechit légèrement vers une position en face du puits du patient, ceci indique que les anticorps du patient se trouvent à un faible titre.

Si aucune réaction n'est observée entre le contrôle positif et l'antigène, le test doit être répété.

INTERPRÉTATION

Une bande d'identité avec un contrôle positif connu indique la présence d'un anticorps du patient contre l'antigène en question. Des réactions d'identité partielle sont considérées comme positives contre l'antigène uniquement si aucune autre réaction d'identité n'est présente sur la plaque. Les réactions de non identité indiquent un test négatif.¹¹

DECLARACION DES RESULTATS DE TEST

Si des réactions d'identité ou d'identité partielle sont observées, le test peut être déclaré "Positif pour les anticorps de (nom de l'antigène)" ou "Réaction d'identité avec (nom de l'antigène)". Des réactions de non identité et des sérums qui ne réagissent pas sont déclarés "Négatif pour les anticorps de (nom de l'antigène) par immunodiffusion".

CONTROLE DE QUALITE

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

Un contrôle qualité utilisateur est réalisé sur chaque test par inclusion d'un sérum de contrôle positif pour antigène il est possible de trouver un sérum de contrôle négatif parmi les patients testés.

Les résultats obtenus avec les contrôles doivent être enregistrés dans un journal adéquat afin de maintenir la qualité des tests et être en conformité avec les règles en vigueur.

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 récente ou active. Des réactions d'identité partielles sont également des indicateurs importants d'une maladie potentielle, particulièrement quand aucune réaction d'identité n'est observée parmi les autres agents. Des réactions de non identité peuvent être apparentes quand l'état de la maladie et causé par un agent mycosique autre que celui testé. Néanmoins, une réaction de non identité est un test négatif pour l'organisme en question.

Si une activité sur un des agents fongiques est observée, une tentative immédiate doit être mise en œuvre pour démontrer l'organisme par la culture en vue d'une confirmation.

Histoplasmosis

Les antigènes cliniques significatifs pour *H. cap* sont les antigènes désignés "H" et "M". (Remarque: La bande "H" apparaît plus proche du puits d'anticorps alors que la bande "M" est plus proche du puits d'antigène.) La bande "M" a été trouvée chez environ 63% des patients avec une histoplasmosis active, alors que la bande "H" est apparente chez seulement 27%. La bande "H" est rarement observée en l'absence d'anticorps contre l'antigène "M". La bande "M" apparaît chez les patients s'étant récemment remis d'une histoplasmosis ainsi que dans le sérum des patients souffrant d'histoplasmosis antérieure dont la peau a été récemment testée.

Dans la mesure où le test peut être négatif dans à peu près 10% des cas démontrés par culture, l'absence de bande "H" ou "M" n'écarte pas la possibilité d'histoplasmosis^{1,5}.

Coccidioidomycosis

Les anticorps dirigés contre l'antigène "F" indiquent la présence d'une infection active ou récente (jusqu'à une an). Le test d'ID est généralement positif dans les quatre semaines après l'infection et reste positif tout au long de la phase clinique active de la maladie. Les tests au latex et de fixation du complément peuvent fournir des informations supplémentaires importantes sur l'état du patient.⁴

Des réactions croisées pouvant être observées chez des patients hébergeant d'autres fungi systémiques (particulièrement *H. cap.*), il convient d'apporter une attention particulière à la lecture des réactions d'identité^{7, 11, 13}.

LIMITES DU TEST

Le taux élevé de tests sérologiques négatifs observés parmi certains cas démontrés en culture limite la valeur prévisionnelle d'un test négatif.

ESPAÑOL

Fungal Immunodiffusion System

REF 100201, 100601

IVD Dispositivo médico para diagnóstico in vitro

Rx Only

USO INDICADO

Los reactivos del Sistema para la Detección de Hongos por Inmunodifusión de Meridian Bioscience son preparaciones estandarizadas y purificadas para la determinación *in vitro* de anticuerpos precipitantes contra dos patógenos que causan micosis sistémicas: *Histoplasma Capsulatum* (*H. cap.*) y *Coccidioides Immittis* (*C. imm.*). Estos reactivos han sido optimizados para uso con la técnica de doble difusión de Ouchterlony.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

H. cap. y *C. imm.* son agentes causales de micosis profundas. Estos hongos presentan al laboratorio microbiológico y al médico un reto para el diagnóstico.

Las lesiones producidas por micosis sistémicas son difíciles de diferenciar mediante radiografías de las lesiones tuberculosas, neoplasmas, tejidos cancerosos y entre las lesiones micóticas mismas. Con frecuencia los síntomas son indistinguibles y pueden asemejarse a los síntomas de varios tipos de neumonías, sarcoidosis, cánceres y otras enfermedades. La detección de los organismos mediante cultivos y estudios histológicos, aún después de intentos repetidos, puede ser difícil.³⁻⁵

Las serologías frecuentes ofrecen la única vía disponible para determinar el tratamiento, sugerir una prognosis o determinar la selección de otras técnicas de diagnóstico más definitivas, tales como cultivos intensivos o biopsias. Además, la serología cuantitativa, tal como el test de fijación de complemento, puede proporcionar información importante sobre los efectos de la quimioterapia.¹¹

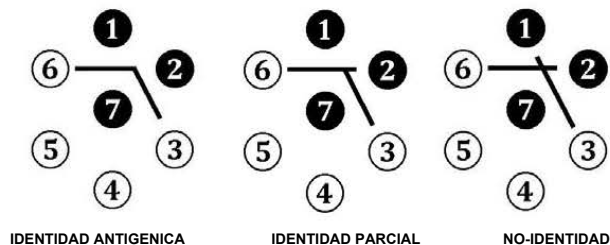
El test para la Detección de Hongos por Inmunodifusión es una herramienta simple y confiable para determinar la presencia de micosis. Con esta técnica pueden analizarse sueros anti-complemento. El test también proporciona datos de especificidad de las reacciones obtenidas mediante el método de fijación de complemento. La técnica de inmunodifusión, siendo simple y no requiriendo equipos costosos, puede ser ejecutada en cualquier laboratorio, y proporciona un excelente método de diagnóstico.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El Sistema para la Detección de Hongos por Inmunodifusión de Meridian Bioscience está basado en el principio de doble difusión descrito por Oudin y Ouchterlony. Un anticuerpo y su antigeno homólogo soluble se dispensan en orificios diferentes que fueron excavados en un medio de difusión de agarosa y se dejan difundir hacia la periferia. Entre los orificios, se desarrolla un gradiente de la concentración de cada componente de la reacción, en la gama de exceso de antigeno cerca del orificio de anticuerpo, hasta exceso de anticuerpo cerca del orificio de antigeno. En el punto de equilibrio entre los gradientes se forma una curva de precipitación visible.⁸⁻¹⁰

Es posible analizar los antígenos y anticuerpos por su "identidad" ubicando un orificio con el material específico que se va a analizar frente a orificios que contienen material de un sistema conocido. Si los complejos antígeno-anticuerpo son idénticos, la precipitación forma una línea de identidad continua con la línea del sistema conocido. También pueden ocurrir reacciones de identidad parcial o de no-identidad. (Ver Figura 1)

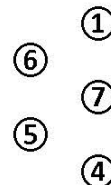
Figura 1



Una reacción de identidad parcial ocurre cuando algunos componentes de los antígenos o anticuerpos son idénticos y otros no lo son. La "espeula" representa los componentes que no están relacionados. No existe identidad cuando los complejos antígeno-anticuerpo son diferentes. La "X", o reacción cruzada que resulta, indica la presencia de dos complejos no relacionados.

Los orificios de la placa de inmunodifusión de Meridian están distribuidos de manera que cada orificio con muestra de paciente se refiere a un sistema conocido y las reacciones de identidad sean fácilmente detectable (vea la Figura 2).

Figura 2. Distribución de sueros y antígenos en el Patrón de orificios de inmunodifusión.



Control de suero positivo, orificios 1 y 4. Suero del paciente, orificios 2, 3, 5 y 6. Antigeno, orificio 7.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

A. **Antígenos.** Los siguientes antígenos componentes del Sistema para la Detección de Hongos por Inmunodifusión están disponibles en frascos de 0,2 mL (No. de Catálogo 100201, 100601), o individualmente, en frascos de 1,0 mL. El antígeno Coccidioidina también está disponible en frascos de 5,0 mL.

1. Histoplasmina. Es un filtrado de cultivo de micelio purificado, derivado del crecimiento de *Histoplasma capsulatum*. Contiene los antígenos "H" y "M". La preparación contiene 100 unidades/mL de cada antígeno. Los lípidos, los componentes del medio y la mayoría de los demás componentes del antígeno han sido eliminados. (Nota: la banda "H" aparece más cerca del orificio con anticuerpo, mientras que la banda "M" está más cerca del orificio con antigeno.)
2. Coccidioidina. Es un filtrado de cultivo purificado. Contiene el antígeno "F" de *Coccidioides immitis* en una concentración de 100 unidades/mL.*

Estos antígenos contienen una concentración final de 0,01% de timerosal como agente preservante. No obstante, deben tomarse precauciones para evitar la contaminación microbiana.

* Estas unidades representan el estándar interno de Meridian y su intento es asegurar la reproducibilidad de la concentración de antigeno de un lote a otro.

B. **Sueros de control.** Los siguientes sueros de control liofilizados se suministran en frascos de 0,4 mL como componentes del Sistema para la Detección de Hongos por Inmunodifusión, o individualmente, en frascos de 1,0 mL. Todos los sueros de control derivan de cabras hiperinmunes (no infectadas) contra preparaciones antigénicas purificadas.

1. Control positivo para histoplasmosis. Contiene anticuerpos específicos contra los antígenos "H" y "M" de *H. capsulatum*. (Nota: la banda "H" aparece más cerca del orificio de anticuerpo, mientras que la banda "M" está más cerca del orificio de antigeno.)
2. Control positivo para coccidioidomycosis. Contiene anticuerpos específicos contra el antígeno "F" de *C. Immitis*.

Estos controles positivos contienen 0,1% de azida de sodio como agente preservante. No obstante, deben tomarse precauciones para evitar la contaminación microbiana.

NOTA: debido a que la producción de reactivos de alta calidad para la detección de hongos en suero requiere estandarización, el desempeño de los antígenos, los sueros de control y las placas no puede ser garantizado si los materiales no provienen de Meridian Bioscience, Inc. El usuario debe aceptar toda responsabilidad por cualquier modificación a los procedimientos descritos en este prospecto.

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

1. Agua de calidad indicada para reactivos.
2. Cámara de humedad. Es satisfactorio el uso de cualquier recipiente conveniente (caja 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 siempre que las placas para ID estén estacionarias, niveladas y se mantengan hidratadas durante la incubación.
3. Luz para la lectura. Los lectores de campo oscuro para placas de agar están disponibles en el comercio. No obstante, es satisfactorio el uso de una lámpara de alta intensidad, si se cubre la pantalla reflectora con papel negro en el cual se ha recortado un pequeño agujero (1 a 2 cm de diámetro) para el paso del haz de luz. Alternativamente, la placa puede sostenerse en un ángulo de 45 grados frente a una fuente de luz indirecta brillante cualquiera, adecuada para la visualización de la placa.
4. Placas para inmunodifusión (Meridian Catalog Number 101009)

PRECAUCIONES

1. Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
2. Las muestras de sangre de pacientes deben ser manipuladas con precaución para evitar la diseminación de agentes etiológicos potencialmente presentes en las muestras.
3. Los sueros de control están preservados con azida de sodio. La acumulación de estas azidas en los tubos de desagüe puede presentar riesgos de explosión. Por lo tanto, se recomienda que el exceso de sueros de control sea desechado en un recipiente apropiado, o eliminado en el desagüe con un chorro abundante de agua.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

Se debe referir a los SDS, disponibles en www.meridianbioscience.com (US version) / www.meridianbioscience.eu (EU version) para las Frases de Peligro y Precaución.

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO

Para mejores resultados, los antígenos contra hongos deben almacenarse a la temperatura de refrigeración (2 C a 8 C). Si se congelan y descongelan repetidamente, los antígenos pueden dañarse. Almacenados entre 2 C y 8 C, permanecen estables hasta la fecha de caducidad indicada en cada frasco.

Los sueros de control positivo permanecen estables en su estado liofilizado hasta la fecha de caducidad indicada en cada frasco, si se almacenan entre 2 C y 8 C. Una vez reconstituidos, se recomienda dividirlos en alcuotas y congelarlos si no serán usados dentro de 30 días. Almacenados a -20 C la viabilidad esperada es un mínimo de nueve meses. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida de los sueros de control. Mientras estén en uso, los sueros de control deben permanecer a temperatura ambiente el mínimo tiempo posible. Las placas para inmunodifusión están empacadas individualmente.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para obtener los mejores resultados, obtenga suero estéril de la sangre del paciente. 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 que pierdan su actividad, siempre que no sean congeladas y descongeladas repetidamente. Las muestras que se transportan entre laboratorios deben ser mantenidas entre 2 C y 8 C para obtener los mejores resultados. Si es necesario, las muestras pueden preservarse con 0,01% de timerosal ó 0,1% de azida de sodio.

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 0,38 mL (para viales de 0,4 mL) ó 0,95 mL (para viales de 1,0 mL) de agua de calidad analítica para reactivos a los viales de suero de control.
2. Para mezclar, golpee suavemente el fondo del vial.
3. Deje que los viales queden a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora, invirtiéndolos de vez en cuando, para mezclar el contenido. No los sacuda.
4. Si después de usarlo por primera vez el suero positivo parece inactivo, es decir da una reacción negativa, es posible que el tiempo de reposo no haya sido suficiente. Si este es el caso, repita el test.
5. Divida en alcuotas y congele el suero restante que no se usará dentro de 30 días. (ver **VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO**.)

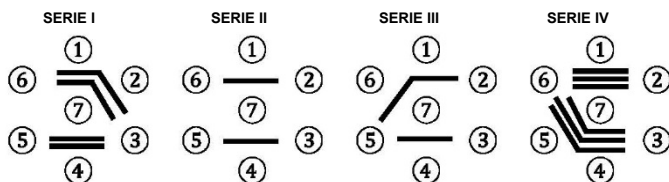
B. Procedimiento del test

1. Refiérase a las figuras 2, 3 y 4 para la designación correcta de los patrones en los orificios de la placa del test.
2. Con las pipetas capilares proporcionadas (sólo en Sistema para la Detección de Hongos por Inmunodifusión) llene los orificios del suero de control de una placa de ID con los sueros de control apropiados en el siguiente patrón:
 - a. Suero de control para *Histoplasma* – Serie I, orificios 1 y 4
 - b. Suero de control para *Coccidioides* – Serie III, orificios 1 y 4

Figura 3.

ANÁLISIS INMUNODIFUSIÓN PARA HONGOS (EJEMPLO DE LA FICHA DE REGISTRO)

Plate No. 5 Date 12-5-01



3. Registre el nombre, la fecha y/o el número de laboratorio para el primer paciente en la línea dos de la columna izquierda (Figura 4) en la ficha del libro de registros. Con un tubo capilar, llene el orificio dos de cada serie I, II, III, IV con el suero del paciente. Usando un tubo capilar nuevo para cada paciente, repita este procedimiento para los orificios de suero números tres, cinco y seis de cada serie.
4. Con un tubo capilar nuevo, llene el orificio del medio de las series I con el antígeno *Histoplasma* y *Coccidioidina* (Serie III).
5. Numere y ponga la fecha en la placa para ID y en la ficha del libro de registro del test.
6. Coloque la placa para ID en una cámara húmeda e incuba a temperatura ambiente durante 24 horas. NOTA: con algunos antígenos pueden observarse las bandas en seis horas. Aún así, será necesario confirmar los resultados de los otros antígenos más tarde.
7. Después de 24 horas (lea y registre las bandas de ID en la ficha de registro (Figura 4)). (Ver **Lectura del Test**.) Si no observa ninguna reacción de identidad en este momento, debe emitirse un informe provisorio. Los resultados positivos deben ser informados inmediatamente.

Figura 4

Orificio No.	SERIE I (<i>Histoplasma</i>) Lectura	SERIE III (<i>Coccidioidina</i>) Lectura
1.	Suero de control	Control Histo
2.	CARTER, R. 3287	BANDAS H y M
3.	LESTER, C. 2519	NEGATIVO
4.	Control Serum	Control Cocci
5.	BARNES, T. 1362	NEGATIVO
6.	HASKAMP, D. 1154	NEGATIVO
7.	Antígeno	<i>Histoplasma</i> <i>Coccidioidina</i>
(Nombre, Dias, No. Lab, etc.)	Después de Incubar durante 24 horas, dibuje sobre la placa las bandas observadas en forma de diagrama (como se ilustra arriba) y registre el número de bandas en los blancos provistos. Nota: las bandas de control han sido incluidas en el diagrama ilustrado. Si estas bandas no se observan en las placas después de 24 horas de incubación, el resultado no es válido y no se debe informar.	

8. Se recomienda un período adicional de 48 horas para confirmar un resultado negativo con cualquier reactivo. Al final de este período, emita un informe final.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

LECTURA DEL TEST

Puede usarse cualquier fuente de luz brillante indirecta para visualizar las bandas de precipitación. Es preferible un fondo oscuro. Por ejemplo, coloque la placa al lado de la pantalla de una lámpara de alta intensidad cuyo haz de luz se dirige directamente hacia abajo sobre una mesa negra.

Una fuente de luz directa también es adecuada si la placa se coloca a 45 grados en el paso del haz de luz, contra un fondo oscuro.

Hay cajas de luz disponibles en el comercio que proporcionan luz indirecta contra un fondo oscuro, preparadas específicamente para la lectura de placas de inmunodifusión.

Es necesario prestar atención especial 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. Las bandas de control que aparentan tomar una posición hacia delante del orificio e muestra del paciente, indican la presencia de un título bajo de anticuerpos en la muestra.

Si no se observa ninguna reacción entre el control positivo y el antígeno, el test debe repetirse.

Tales reacciones pueden analizarse inundando la placa con 1 M de citrato de sodio durante cinco minutos. Las reacciones que desaparecen después de este tratamiento son causadas por la proteína reactiva C y pueden ser ignoradas.

INTERPRETACIÓN

Una banda de identidad con un control positivo conocido indica la presencia del anticuerpo contra el antígeno específico en la muestra del paciente. Las reacciones con identidad parcial se consideran positivas para el anticuerpo contra el antígeno solamente si no se produce ninguna otra reacción de identidad en la placa. Las reacciones de no-identidad se consideran negativas.¹¹

INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL TEST

Si se observan reacciones de identidad o identidad parcial, el test puede informarse como "Positivo para anticuerpos contra (nombre del antígeno)" o bien, "Reacción de identidad con (nombre del antígeno)". Las reacciones de no-identidad y los sueros no reactivos pueden informarse como "Negativo para anticuerpos contra (nombre del antígeno) por inmunodifusión".

CONTROL DE CALIDAD

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

El usuario realiza el control de calidad de cada corrida del test incluyendo un suero de control positivo por cada antígeno. Generalmente, puede encontrarse un control negativo entre las muestras analizadas de varios pacientes.

Los resultados de los controles deben ser anotados en un libro de registros apropiado, para mantener la alta calidad de los procedimientos del test y cumplir con las estipulaciones de los organismos regulatorios.

Si los resultados operados 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

En general, una reacción de identidad contra un antígeno particular indica una infección activa o reciente. Las reacciones de identidad parcial también son indicadores importantes de enfermedad probable, particularmente cuando no se observan reacciones de identidad con otros agentes. Las reacciones de no-identidad pueden manifestarse cuando el estado patológico es causado por un agente micótico diferente del analizado en el test. Sin embargo, éstas indican un resultado negativo del test para el organismo que fue analizado.

Si se observa actividad contra cualquiera de los agentes micóticos, se debe intentar detectar mediante cultivos la presencia del organismo para confirmar la observación.

Histoplasmosis

Los antígenos clínicamente significativos para *H. cap.* tienen la designación "H" y "M". (Nota: la banda "H" aparece más cerca del orificio de anticuerpo, mientras que la banda "M" está más cerca del orificio de antígeno). Se ha detectado la banda "M" en aproximadamente el 63% de los pacientes con histoplasmosis activa, mientras que la banda "H" sólo se detectó en el 27% de los pacientes. La banda "H" se observa muy raramente cuando los anticuerpos contra el antígeno "M" están ausentes. La banda "M" puede aparecer en muestras de pacientes que se han recuperado de histoplasmosis reciente, así como en el suero de pacientes con histoplasmosis previa que recientemente se sometieron a un test cutáneo.

Debido a que el test puede ser negativo hasta en el 10% de los casos confirmados positivos por métodos de cultivo la ausencia de las bandas "M" o "H" no descarta la presencia de histoplasmosis.^{1,5}

Coccidioidomicosis

Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno "F" indican una infección activa o reciente (hasta un año). El test de inmunodifusión (ID) generalmente proporciona resultados positivos dentro de cuatro semanas después de la infección, y continúa positivo durante el curso de la enfermedad clínicamente activa. Los test con látex y de fijación de complemento pueden proporcionar información adicional importante sobre el estado del paciente.⁴

Es posible observar reacciones cruzadas en las muestras de pacientes afectados con otras micosis sistémicas (especialmente *H. cap.*). Por lo tanto, las reacciones de identidad deben ser interpretadas con mucha atención.^{7,11}

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El alto nivel de test serológicos negativos que ha sido observado en casos positivos demostrados por cultivo limita el valor predictivo de un test negativo.

DEUTSCH

Fungal Immunodiffusion System

REF 100201, 100601

IVD In-vitro-Diagnostikum

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Die Fungalimmunodiffusionsreagenzien von Meridian Bioscience sind standardisierte, gereinigte Präparate für den Invitro-Nachweis der präzipitierenden Antikörper zu zwei systemischen mykotischen Pathogenen: *Histoplasma capsulatum* (*H. cap.*) und *Coccidioides immitis* (*C. imm.*). Diese Reagenzien wurden für den Gebrauch im Rahmen der Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony optimiert.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

H. cap. und *C. imm.* gehören zu den Ursachen tiefliegender Mykosen. Diese Pilze stellen eine diagnostische Herausforderung an den Arzt und Laborchemiker dar.

Röntgenologisch können die von den systemischen Pilzen hervorgerufenen Läsionen schwer von tuberkulösen Läsionen, Neoplasmen, Karzinomgeweben sowie voneinander zu unterscheiden sein. Die Symptome sind oft unauffällig und können verschiedene Pneumonien, Sarkoidosen, Karzinome und andere Erkrankungen ähnlich sein. Die Organismen sind kulturell und histologisch schwierig nachzuweisen, selbst bei wiederholten Versuchen.³⁻⁵

Oft bieten serologische Untersuchungen den einzig verfügbaren Nachweis, um Hinweise auf Behandlung und Prognose zu geben oder zur Auswahl einer definitiveren diagnostischen Technik wie z.B. intensive Kultur oder Biopsie zu führen. Außerdem kann die quantitative Serologie wie. Z.B. komplementäre Fixationstestung, wichtige Hinweise auf die Wirkung der Chemotherapie bieten.¹¹

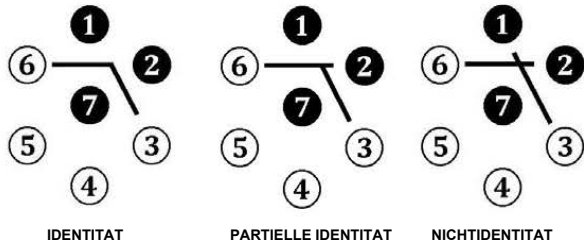
Der Fungalimmunodiffusionstest ist ein einfaches, verlässliches Werkzeug bei der Bewertung von verdächtigen Mykosen. Antikomplementäre Seren können mit diesen Verfahren getestet werden. Die Tests bieten darüber hinaus Spezifitätsdaten zu Reaktionen, die mit der komplementären Fixationsmethode erhalten werden. 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

Das Fungalimmunodiffusionssystem von Meridian Bioscience beruht 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 Agar-Diffusionsmedium geschnitten werden, und diffundieren nach außen. Zwischen den beiden Wells bildet sich ein Konzentrationsgradient von den einzelnen Reaktionskomponenten, der von dem Antigenüberschuss, der dem Antikörperwell am nächsten liegt, zum Antikörperüberschuss, der dem Antigenwell am nächsten liegt, reicht. Ein sichtbare Präzipitallinie bildet sich am Äquivalenzpunkt.⁸⁻¹⁰

Antigene oder Antikörper können auf ihre "Identität" hin getestet werden, indem man einen Testwell mit der in Frage stehenden Substanz neben den Wells eines bekannten Systems positioniert. Wenn die Antigen-Antikörperkomplexe identisch sind, bilden die Präzipitallinien eine durchgehende Identitätslinie mit dem bekannten System. Partielle und Nichtidentitätslinien sind ebenfalls möglich. (siehe Abbildung 1)

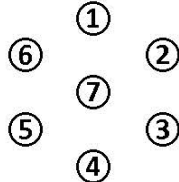
Abbildung 1.



Eine partielle Identitätsreaktion tritt auf, wenn bestimmte Komponenten des Antigens (oder des Antikörpers) identisch und andere nicht identisch sind. Der "Sporn" repräsentiert die Komponenten, die nicht verwandt sind. Eine Nichtidentitätsreaktion tritt dann auf, wenn die Antigen-Antikörperkomplexe unterschiedlich sind. Die sich dann bildende "X" – oder Kreuzreaktion zeigt an, dass zwei unverwandte Komplexe vorhanden sind.

Die Wellmuster der Meridian Immundiffusionsplatte sind so aufgebaut, dass jedem Patiententestwell ein bekanntes Referenzsystem entspricht, so dass Identitätsreaktionen offensichtlich erkennbar sind (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2. Anordnung von Seren und Antigen im Immundiffusions-Wellmuster



Kontrollpositives Serum: Wells 1 und 4. Patientensera: Wells 2, 3, 5 und 6. Antigen: Well 7.

REAGENZ/ENTHALTENE MATERIALIEN

Die Höchstkonzentration der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Außenseite der Packung angegeben.

- A. **Antigene:** Die folgenden Antigene sind zu 0,2 mL als Teil des Fungalmunddiffusionssystems (Katalognr. 100201, 100601) oder einzeln zu 1,0 mL erhältlich. Das Coccidioidin-Antigen ist zudem zu 5,0 mL erhältlich.
1. **Histoplasmin.** Eine gereinigtes Myzel-Kulturfiltrat vom Wachstum des *Histoplasma capsulatum*, das die "H" – und "M" – Antigene enthält. Das Präparat enthält 100 Einheiten pro mL * jedes Antigens. Lipide, Medienkomponenten und die meisten anderen antigenen Komponenten sind entfernt worden. (Hinweis: Das "H" – Band erscheint in nächster Nähe zum Antikörperwell, während das "M" – Band sich in nächster Nähe des Antigenwells befindet.)
 2. **Coccidioidin.** Ein gereinigtes Kulturfiltrat, das "F" – Antigen von *Coccidioides immitis* zu einer Konzentration von 100 Einheiten pro mL enthält.*

Die Antigene enthalten Thimerosal zu einer Endkonzentration von 0,01% als Konservierungsstoff. Vorsicht ist jedoch geboten, dass mikrobielle Kontamination verhindert wird.

* Diese Einheiten sind interne Meridiannormen, die nur dazu bestimmt sind, eine Wiederholbarkeit der Antigenkonzentration von Charge zu Charge zu gewährleisten.

- B. **Kontrollseren:** Die folgenden lyophilisierten Kontrollseren sind zu 0,4 mL als Teil des Fungalmunddiffusionssystems oder einzeln zu 1,0 mL erhältlich. Alle Kontrollseren werden in hyperimmunem (nicht infizierten) Ziegen gegen gereinigte Antigenpräparate gezüchtet.
1. **Histoplasma-positiv Kontrolle.** Enthält spezifische Antikörper, die gegen die "H" und "M" – Antigene von *H. capsulatum* gerichtet sind. (Hinweis: Das "H" – Band erscheint in nächster Nähe zum Antikörperwell, während das "M" – Band sich in nächster Nähe des Antigenwells befindet.)
 2. **Coccidioidomykose-positiv Kontrolle.** Enthält spezifische Antikörper, die gegen das "F" – Antigen des *C. immitis* gerichtet sind.

Diese positiven Kontrollseren sind mit 0,1% Natriumazid konserviert. Vorsicht sollte trotzdem walten, um mikrobielle Kontaminierung zu verhindern.

HINWEIS: Aufgrund der für die Produktion von qualitativen hochwertigen Fungalerologie-Produkten von Meridian Bioscience notwendigen Standardisierung kann die Testleistung, die mit Antigenen, Kontrollseren und Platten mit Materialien außer den von Meridian Bioscience, Inc. hergestellten Stoffen nicht gewährleistet werden. Der Verbraucher nimmt die volle Verantwortung für jegliche Modifizierung der hierin veröffentlichten Verfahren auf sich.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

1. Wasser von Reagenzqualität.
2. Feuchtkammer: jeglicher angemessene Behälter, wie z.B. eine Petrischale, eine Plastikschachtel oder ein Glasbecher mit einem festschließenden Deckel, der ein feuchtes Filterpapier oder Papiertuch enthält, ist unter der Voraussetzung ausreichend, dass die ID-Platten stationär und eben stehen und während der Inkubation feucht gehalten werden.
3. Leseleuchte: Dunkelfeld-Plattenleuchten sind im Handel erhältlich, allerdings kann ein zufriedenstellendes System aufgebaut werden, indem eine Hochintensitätsleuchte, in der die Vorderseite des Birnenschutzreflektors mit schwarzer Pappe abgedeckt ist, in die ein kleines Loch (1-2 cm im Durchmesser) zur Beleuchtung geschnitten wird. Als Alternative kann die Platte in einem 45° - Winkel vor fast jede helle, indirekte Lichtquelle gehalten werden, um ausreichende Visualisierung zu gewährleisten.
4. Immundiffusionsplatten (Meridian Catalog Number 101009)

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Bei der Handhabung von Blutproben sollten angemessene Maßnahmen ergriffen werden, um die Verbreitung von ätiologischen Wirkstoffen zu verhindern, die potenziell in der Probe enthalten sind.
3. Die Kontrollseren werden mit Natriumazid konserviert. Die Akkumulierung dieser Chemikalien in Metallabflussrohren kann eine Explosionsgefahr darstellen. Daher wird empfohlen, den Überschuss an Kontrollserum einfach in einem angemessenen Abfallbehälter zu entsorgen oder mit reichlich Wasser den Abfluss hinunter zu spülen.

GEFÄHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

Für weitere Informationen zu den Gefahren- und Sicherheitshinweisen, beziehen Sie sich auf die SDS, die unter folgendem Link verfügbar sind www.meridianbioscience.com (US Version) / www.meridianbioscience.eu (EU Version).

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Fungale Antigene werden am besten bei Kühltemperaturen (2 bis 8 C) gelagert. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist schädlich für diese Antigene. Wenn die Antigene bei 2 bis 8 C aufbewahrt werden, sind sie bis zum auf jeder Flasche angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil.

Positive Kontrollseren sind im lyophilisierten Zustand bis zum Haltbarkeitsdatum stabil, das auf jeder Flasche angegeben wird, wenn sie bei 2 bis 8 C aufbewahrt werden. Wenn sie rekonstituiert werden, wird empfohlen, sie zu aliquotieren und einzufrieren, falls sie nicht innerhalb von einem Monat verwendet werden. Bei -20 C kann eine Mindesthaltbarkeit von neun Monaten erwartet werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Wenn die positiven Kontrollseren verwendet werden, sollte die Verwendungszeit bei Raumtemperatur so kurz wie möglich gehalten werden.

PROBENNAHME UND VORBEREITUNG

Zur Erzielung einer optimalen Leistung wird steriles Serum vom Blut des Patienten gewonnen.

Wenn bei der Verarbeitung der Probe eine Verzögerung entsteht, ist eine Kühlung bis zu 72 Stunden möglich. Proben können bis zu sechs Monate lang bei -20 C eingefroren werden, ohne an Aktivität zu verlieren, vorausgesetzt, dass sie nicht wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren werden. Proben, die sich zwischen Labors im Transport befinden, sollte bei Temperaturen von 2 bis 8 C gehalten werden, damit eine optimale Leistung erzielt werden. Proben können falls notwendig mit 0,01% Thimerosal oder 0,1% Natriumazid konserviert werden.

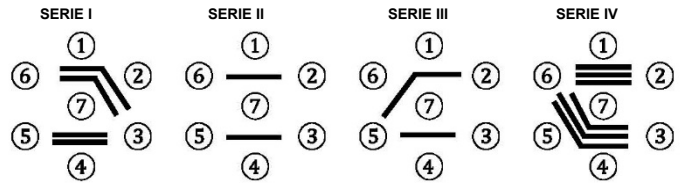
TESTDURCHFÜHRUNG

- A. **Rekonstitution des positiven Kontrollserums**
1. Mit einer 1,0 mL Pipette oder einer Tuberkulinspritze geben Sie 0,38 mL Wasser von Reagenzqualität (bei 0,4 mL Fläschchen) bzw. 0,95 mL (bei 1,0 mL Fläschchen) in die Kontrollserumfläschchen. "Schnipsen" Sie den Boden der Fläschchen vorsichtig an, um den Inhalt zu mischen.
 2. Lassen Sie die Fläschchen ungefähr eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen und drehen Sie gelegentlich um, um den Inhalt zu mischen (nicht schütteln).
 3. Wenn das Serum bei der ersten Verwendung inaktiv zu sein scheint, kann es sein, dass die Fläschchen nicht lange genug stehen gelassen wurden, in diesem Fall wiederholen Sie den Test.
 4. Aliquotieren Sie das Serum und frieren Sie die Menge an Kontrollserum ein, die nicht innerhalb von einem Monat verwendet werden wird (siehe **HALTBARKEIT UND LAGERUNG**).
- B. **Testverfahren**
1. Befolgen Sie die Abbildungen 2, 3 und 4 zur korrekten Zuweisung des Testwellmusters.
 2. Mit den mitgelieferten Kapillarpipetten (nur beim Fungalmunddiffusionssystem) füllen Sie die Kontrollserumwells einer ID-Platte mit den jeweiligen Kontrollseren wie folgt:
 - a. Histoplasma-Kontrollserum Serie I, Wells 1 und 4.
 - b. Coccidioides - Kontrollserum, Serie III, Wells 1 und 4.

Abbildung 3

FUNGALE IMMUNDIFFUSIONSANALYSE (BEISPIELFORMULAR)

Plate No. 5 Date 12-5-01



3. Schreiben Sie den Namen, das Datum und/oder die Labornummer des ersten Patienten in die zweite Zeile der linken Spalte (Abbildung 4) des Aufzeichnungsformulars und füllen Sie Well zwei jeder einzelnen Serie I, II, III, IV mit einem Kapillarröhrchen mit dem Serum des Patienten. Verwenden Sie ein frisches Kapillarröhrchen für jeden Patienten und wiederholen Sie das Verfahren für zusätzliche Seren in den Wells drei, fünf und sechs jeder Serie.
4. Füllen Sie mit einem frischen Kapillarröhrchen den Well in der Mitte von Serie I mit Histoplasmin-Antigen und Coccidioidin-Antigen (Serie III).
5. Versehen Sie die ID-Platte und das Analyseformular mit Nummer und Datum.
6. Stellen Sie die ID-Platte in eine feuchte Kammer und inkubieren Sie 24 Stunden lang bei Raumtemperatur. HINWEIS: bei einigen Seren erscheinen Bänder u.U. schon nach sechs Stunden. Trotzdem ist es notwendig, die Ergebnisse der anderen Seren später zu bestätigen.
7. Nach 24 Stunden lesen Sie ID-Bänder ab und zeichnen Sie auf dem Analyseformular auf (Abbildung 4). (Siehe **Abllesen des Tests**.) Ein Zwischenbericht sollte zu diesem Zeitpunkt ausgestellt werden, wenn keine Identitätsreaktionen beobachtet werden. Positive Resultate sollten sofort berichtet werden.

Abbildung 4.

Well Nr.	SERIE I (Histoplasmin) Ablesung	SERIE III (Coccidioidin) Ablesung	
1.	<u>Kontrollserum</u>	<u>Histo. Kontrolle</u>	<u>Cocci. Kontrolle</u>
2.	<u>CARTER, R. 3287</u>	<u>H und M BANDER</u>	<u>NEGATIV</u>
3.	<u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIV</u>	<u>NEGATIV</u>
4.	<u>Kontrollserum</u>	<u>Histo. Kontrolle</u>	<u>Cocci. Kontrolle</u>
5.	<u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIV</u>	<u>NEGATIV</u>
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>NEGATIV</u>	<u>NEGATIV</u>
7.	<u>Antigen</u>	<u>Histoplasmin</u>	<u>Coccidioidin</u>
(Name, Datum, Labornr., usw.)			

Nach 24 stündiger Inkubation zeichnen Sie die beobachteten Bänder in das obige Well-Diagramm ein und tragen Sie die Anzahl der Bänder in die Leerstellen ein.
Hinweis: Die Kontrollbänder sind in das obige Well-Diagramm eingetragen worden. Wenn diese Bänder nicht nach 24 Stunden Inkubationszeit auf den Platten beobachtet werden, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

8. Ein zusätzliche 48 stündige Inkubationszeit wird zur Bestätigung eines negativen Ergebnisses empfohlen. Ein endgültiger Bericht wird zu Abschluss dieser Frist erstellt.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

ABLESEN DES TESTS

Jede Art einer hellen, indirekten Lichtquelle kann als Sichthilfe der 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° - Winkel gegen einen dunklen Hintergrund gehalten wird.

Leuchtkästen, die indirektes Licht gegen einen dunklen Hintergrund bieten und besonders zum Ablesen von Immundiffusionsplatten vorbereitet 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 auf eine Position vor dem Patientenwell.

Derartige Reaktionen können gestestet werden, indem fünf Minuten lang mit 1 Mol Natriumzitat geflutet wird. Reaktionen, die nach dieser Behandlung verschwinden, sind aufgrund des C-reaktiven Proteins aufgetreten und können ignoriert werden.

AUSWERTUNG

Ein Identitätsband mit der positiven Kontrolle zeigt einen Patienten-Antikörper gegen das in Frage stehende Antigen an. Teilweise Identitätsreaktionen werden nur dann als Antikörper-positiv gegen das Antigen betrachtet, wenn keine andere Identitätsreaktion auf der Platte stattfindet. Nicht-Identitätsreaktionen werden als negatives Testergebnis gewertet.¹¹

BERICHTEN DER TESTERGEBNISSE

Wenn Identitäts – oder partielle Identitätsreaktionen beobachtet werden, enthält der Testbericht "Positiv für Antikörper gegen (Name des Antigens)" oder "Identitätsreaktion mit (Name des Antigens)" bewertet. Nicht-Identitätsreaktionen und nichtreaktive Seren können so berichtet werden: "Negativ für Antikörper gegen (Name des Antigens) nach Immundiffusion".

QUALITÄTSKONTROLLE

Den Test gemäß der einschlägigen lokalen, bundesstaatlichen oder nationalen bzw. zulassungsbehördlichen Auflagen durchführen.

Die Verbraucher-Qualitätskontrolle wird bei jedem Testdurchlauf durch den Einschluss eines positiven Kontrollserums für jedes Antigen durchgeführt. Eine negative Kontrolle kann normalerweise unter den verschiedenen getesteten Patienten gefunden werden.

Die mit den Kontrollen erhaltenen Ergebnisse sollte in einem angemessenen Logbuch vermerkt werden, um hohe Qualitätsstandards einzuhalten und die Erfordernisse der Aufsichtsbehörden zu erfüllen.

Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, zur Ermittlung der Ursache des Versagens als Erstes die Kontrolltests wiederholen. 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 Distributor.

ERWARTETE WERTE

Im Allgemeinen ist eine Identitätsreaktion gegen ein gegebenes Antigen ein Hinweis auf eine aktive oder kürzlich abgelaufene Infektion. Partielle Identitätsreaktionen sind ebenfalls wichtige Indikatoren einer wahrscheinlichen Erkrankung, besonders, wenn keine Identitätsreaktion unter den anderen Stoffen festgestellt wird. Nicht-Identitätsreaktionen können auftreten, wenn der Krankheitszustand von einem mykotischen Wirkstoff hervorgerufen wird, der sich von dem getesteten Wirkstoff unterscheidet. Allerdings ist eine Nicht-Identitätsreaktion ein negatives Testergebnis für den in Frage stehenden Organismus.

Wenn eine Aktivität gegen einen der mykotischen Stoffe beobachtet wird, sollte ein entschiedener Versuch unternommen werden, den Organismus kulturell zur Bestätigung zu demonstrieren.

Histoplasmose

Die klinisch bedeutsamen Antigene für *H. cap.* sind die designierten "H" – und "M" – Antigene. (Hinweis: das "H" – Band erscheint in nächster Nähe zum Antikörperwell, während das "M" – Band neben dem Antigenwell erscheint.) Das "M" – Band wurde in ungefähr 63% der Patienten mit aktiver Histoplasmose gefunden, während das "H" – Band nur bei 27% der Patienten erscheint. Das "H" – Band wird selten beobachtet, wenn Antikörper gegen das "M" – Antigen nicht vorhanden sind. Das "M" – Band kann bei Patienten erscheinen, die kürzlich von einer Histoplasmose genesen sind, sowie im Serum von früheren Histoplasmose – Patienten, die sich kürzlich einem Hauttest unterzogen haben.

Dar der Test in bis zu 10% der kulturell demonstrierten Fälle negativ ausfallen kann, schließt ein fehlendes "H" – oder "M" – Band Histoplasmose nicht aus.^{1,5}

Coccidioidomykose

Antikörper, die gegen das "F" – Antigen gerichtet sind, zeigen eine aktive oder in der näheren Vergangenheit abgelaufene (d.h. im Abstand von bis zu einem Jahr) Infektion an. Der ID-Test ist normalerweise innerhalb von vier Wochen nach der Infektion positiv und bleibt über die klinisch aktive Erkrankung hinweg positiv. Latex – und komplementäre Fixationstests können wichtige zusätzliche Informationen über den Zustand des Patienten liefern.⁴

Kreuzreaktionen können bei Patienten beobachtet werden, die Wirte anderer systemischer Pilzkrankungen sind (besonders *H. cap.*), sodass bei der Ablesung von Identitätsreaktionen besonders achtgegeben werden muss.^{7, 11}

EINSCHRÄNKUNGEN

Die hohe Rate von negative serologischen Tests, die unter bestimmten kulturell demonstrierbaren Fällen beobachtet wird, schränkt den Vorhersagewert eines negativen Tests ein.

REFERENCES

- Bauman DS and Smith CD. 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, Chapters 1, 2 and 4. 1973.
- Heiner DC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics*, 1958; 22:616-627.
- Huppert M and Bailey JW. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis. *Amer J Clin Path* 1965; 44:364-368.
- Kaufman L. Value of immunodiffusion tests in the diagnosis of systemic mycotic diseases. *Ann Clin Lab Sci* 1973; 3:14146.
- 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. C. C. Thomas Publishing, Springfield, 1975; pp. 47-57.
- Kaufman L and Clark MJ. 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 Immunoelectrophoresis. Ann Arbor Publishers, Inc., Ann Arbor. 1968.
- Oudin J. L'analyse, immunochimique qualitative. Methode par diffusion des antigenes au sein de l'immunserum precipitant gelose. *Premier parse.* Ann Inst. Pasteur, 1948; 75:30-52.
- Palmer DF, et al., Serodiagnosis of Mycotic Diseases. C. C. Thomas Publishing, Springfield, 1977; pp 78.
- Smith CE. Coccidioidomycosis. *Med. Clin. North Amer.*, 1943; 27:790-807.
- Smith CE, Saito MT, Beard RR, Kepp KM, Clark RW and Eddie BV. 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.



SN10400

REV. 04/16

 Manufactured By	Meridian Bioscience, Inc. USA/Corporate Office 3471 River Hills Drive Cincinnati, Ohio 45244 Telephone: 513.271.3700 Orders/Customer Service: 800.543.1980 Technical Support Center: 800.343.3858 Information Fax: 513.272.5432 Ordering Fax: 513.271.0124
 Authorized Representative	Meridian Bioscience Europe S. r. L Via dell'Industria, 7 20020 Villa Cortese, Milano ITALY Tel: +39 0331 43 36 36 Fax: +39 0331 43 36 16 Email: info@meridianbioscience.eu WEB: www.meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe s.a./n.v.
 2 Avenue du Japon - 1420 Braine l'Alleud
 BELGIUM
 Tel: +32 (0) 67 89 59 59
 Fax: +32 (0) 67 89 59 58
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France
 34 rue de Ponthieu - 75008 Paris
 FRANCE
 Tel: +33 (0) 1 42 56 04 40
 Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
 Email: info.fr@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe b.v.
 Postbus 301 - 5460 AH Veghel
 NETHERLANDS
 Tel: +31 (0) 411 62 11 66
 Fax: +31 (0) 411 62 48 41
 Email: info.bn@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

You may see one or more of these symbols on the labeling/packaging of this product:

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guia de simbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	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	EC REP	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
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione. Sistema pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	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
	Contents sufficient for n tests / Contenuto sufficiente per n saggi / Contenu suffisant pour n tests / Contenido suficiente para n ensayos / Inhalt ausreichend für n Proben	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontroltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Date di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone / Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweis
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration: 20X / Soluzione di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
R. Only	Caution: US Federal law restricts this device to sale by or on the order of a licensed healthcare practitioner. / La legge Federale negli Stati Uniti prevede che questo test sia venduto solo a un operatore autorizzato ad operare nella salute. / Attention: La vente ou la prescription de ce dispositif par un médecin agréé est soumise à des restrictions par la loi fédérale des US. / Cuidado: Los leyes federales de los EE.UU. limitan la venta de dispositivos por o por el orden de licenciados en la práctica del cuidado de la salud. / Vorzicht: Der Verkauf oder die Verschreibung dieses Geräts durch einen zugelassenen Arzt unterliegt den Beschränkungen des US Bundesgesetzes.	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Détection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

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.