

COCCIDIOIDES "F" ANTIGEN FOR FUNGAL IMMUNODIFFUSION

REF

100401, 100405,
100801, 103001, 103101

IVD

In vitro diagnostic medical device

Rx Only

INTENDED USE

Meridian Bioscience Coccidioides Immunodiffusion Reagents are standardized, purified preparations for the in vitro determination of precipitating antibodies to *Coccidioides immitis* (*C. imm.*). Reagents are available for detection of either "TP" (early) or "F" (late) antibodies. These reagents are optimized for use in the Ouchterlony double diffusion method.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Coccidioides immitis is one of the causative agents of deep-seated mycoses. Though somewhat localized in the southwestern United States, modern transportation has increased the likelihood of infection for individuals visiting the region.

The disease presents a diagnostic challenge to the physician and laboratorian. Radiographically, lesions produced by the systemic fungi may be difficult to distinguish from each other, tuberculous lesions, neoplasms, (benign and malignant). Symptoms are often unremarkable and can mimic various pneumonias, sarcoidosis, cancer and other maladies. Culturally and histologically the organisms can be difficult to demonstrate, even after repeated attempts.³

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.¹⁸

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

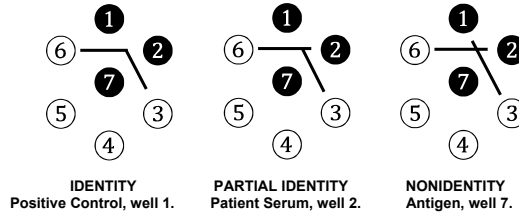
Use of the immunodiffusion, coccidioides "F" (IDCF) test alone for the serodiagnosis of coccidioidomycosis is not recommended since, in general, only IgG antibody is detected. When used together with the Coccidioides Latex Agglutination System for *C. imm* antibodies, 93% of active coccidioidomycosis patients were positive in one or both tests (CL or ID). In addition, IgM antibody against *Coccidioides immitis* may be detected using the Meridian Coccidioides IDTP antigen and control serum set.^{4,6,12}

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The Meridian Bioscience Coccidioides 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.¹⁰⁻¹²

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)

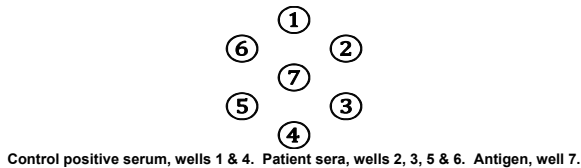
Figure 1. Identification of Immunodiffusion Bands



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

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. Arrangement of sera and antigens in immunodiffusion well pattern.



Early antibody, (IgM) is detected by the "TP" antigen. Late antibody, (IgG) is detected by the "F" antigen. The results obtained with the "TP" antigen parallel that of tube precipitin and latex tests, while the results obtained with the "F" antigen are similar to those observed with complement fixation.^{14, 16, 18}

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

- Antigen:** Coccidioides antigens are available in 1.0 mL and 5.0 mL sizes. The available antigens consist of purified cultural filtrates containing either the "F" or "TP" antigen of *Coccidioides immitis* at a concentration of 100 units/mL. The antigens contain thimerosal at a final concentration of 1:10,000 as a preservative. Care should be exercised, however, to avoid microbial contamination. *These units are internal Meridian standards designed only to ensure lot to lot reproducibility of antigen concentration.
- Control Sera:** Anti-Coccidioides lyophilized control serum is provided in a 1.0 mL size. Control serum contains goat, rabbit or human serum with antibodies directed against either the "F" or "TP" antigen of *C. immitis* (see PRECAUTIONS). These positive control sera are preserved with 0.1% sodium azide. Care should be exercised to avoid microbial contamination.
- Immunodiffusion Plates:** Twelve ID plates are provided. When four sera per plate are tested, sufficient materials are provided to test 48 patient sera. ID plates may be obtained by ordering Meridian Catalog #101012. The immunodiffusion plates consist of 0.9% agarose in glycine/phosphate buffer at pH 7.4 + 0.2.

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

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

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Reagent quality water.

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

PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
- Patient specimens and control serum may contain infectious agents. The control serum may contain human serum which was screened for HBsAg and antibody to HIV and found to be negative. However, no test can offer complete assurance that human blood will not transmit HIV, hepatitis or other infectious agents. Therefore, patient specimens, control serum, used ID plates and other potentially hazardous material should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
- 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 Hazard and Precautionary Statements.

SHELF LIFE AND STORAGE

Coccidioides antigens are best stored at refrigerator temperature (2-8 C). Repeated freezing and thawing is detrimental to these antigens. Extreme heat (more than 60 C) is also to be avoided. When stored at 2-8 C the antigens are stable at least 24 months from the date of manufacture.

Positive control sera are stable in the lyophilized state for a minimum of 24 months from the date of manufacture 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.

Immunodiffusion plates are individually packaged and if unopened and stored at 2-8 C, an 18 month minimum shelf life may be expected. If plate packages are opened and the plates must be stored before use, they must be placed in a tightly sealed, humid container to avoid drying. A resealable plastic container with a small moist sponge or towel is ideal.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- For optimal results, sterile serum is obtained from the patient's blood.
- If a delay is encountered in specimen processing, refrigeration for up to 72 hours is permissible. Specimens may be stored up to six months at -20 C with no loss of activity, provided they are not repeatedly thawed and refrozen. Specimens in transit between laboratories should be maintained at 2-8 C for optimal results. Specimens may be preserved with 1:10,000 thimerosal or 0.1% sodium azide if necessary.
- Greater sensitivity can be achieved when performing the "TP" antibody test by concentrating the patient's serum approximately 8:1.¹³⁻¹⁶ This can be accomplished by pervaporation or use of a 125000 molecular weight cutoff membrane filter (e.g. Amicon™ B-125 or equivalent). While various strategies are available for pervaporation, the serum may be simply placed in a short length of dialysis tubing and air dried or gently warmed with a hand dryer until the correct volume reduction is obtained.
- In a limited clinical study, a 15% increase in sensitivity was obtained when specimens were concentrated by pervaporation and allowed to prediffuse for two hours prior to addition of antigen. (Pappagianis, et al., personal communication)

TEST PROCEDURE

A. Reconstitution of positive control serum.

- Using a 1.0 mL pipet or tuberculin syringe add 0.95 mL of reagent quality water to the control serum vials.
- Gently "flick" the bottom of the vials to mix.
- Allow the vials to stand at room temperature for about 1 hour, occasionally inverting to mix. (Do not shake)
- If, on its first use, the serum appears inactive, it may be that sufficient standing time was now 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)

B. Test procedure

- Please refer to figures 2, 3 and 4 for proper designation of the test well pattern.
- Using the provided capillary pipets (Coccidioides Immunodiffusion System only), fill the control serum wells (1 & 4) of an ID plate.

Figure 3.

FUNGAL IMMUNODIFFUSION ANALYSIS
(SAMPLE FORM)

Plate No. 5 Date 8-23-02

TEST SERIES I

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

Figure 4.

Well Number	TEST
1. Control Serum	Cocci Control
2. CARTER, R. 3287	NEGATIVE
3. LESTER, C. 2519	NEGATIVE
4. Control Serum	Cocci Control
5. BARNES, T. 1362	NEGATIVE
6. HASKAMP, D. 1154	I-BAND
7. Antigen	Coccidioidin

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

After 24 hour incubation, draw bands observed on the well diagram above and record the number of bands on the blanks provided.
NOTE: The control bands have been drawn on the well diagram above. If these bands are not observed on the plates after 24 hour incubation, the test is not valid and must be repeated.

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

READING THE TEST

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

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

INTERPRETATION OF RESULTS

A band of identity with the positive control indicates patient antibody against *Coccidioides immitis*. Partial identity reactions are also regarded as positive for antibody. Non-identity reactions are regarded as a negative test.¹¹

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 Service Department at 1-800-343-3858 (US) or your local distributor.**

EXPECTED VALUES

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

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

Latex and complement fixation testing may provide important additional information regarding patient status.⁴⁻⁶

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

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

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The high rate of negative serologic tests observed among certain culturally demonstrable cases limits the predictive value of a negative test.²⁰ Cross-reactions may be observed in patients harboring infections caused by other systemic fungi. While these may be easily distinguished from the identity lines produced against coccidioidin, their true identity will not be apparent in a system limited to one antigen.

ITALIANO

COCCIDIOIDES "F" ANTIGEN FOR FUNGAL IMMUNODIFFUSION



100401, 100405,
100801, 103001, 103101



Dispositivo medico-diagnostico in vitro

Rx Only

FINALITÀ D'USO

I reagenti per l'immunodiffusione dei coccidioides Meridian Bioscience sono soluzioni standardizzate purificate per la determinazione in vitro degli anticorpi di precipitazione del *Coccidioides immitis* (*C. imm.*). I reagenti possono inoltre essere utilizzati per rilevare la presenza di anticorpi "TP" (recenti) o "F" (pregressi). Questi reagenti sono adatti per essere utilizzati con il metodo di Ouchterlony o immunodiffusione doppia.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Coccidioides immitis costituiscono uno degli agenti responsabili delle micosi profonde. Sebbene siano circoscritti alla zona sud-occidentale degli Stati Uniti, i moderni mezzi di trasporto hanno determinato un aumento delle probabilità di contagio per le persone che si recano in questa regione.

La malattia rappresenta una sfida a livello diagnostico per i medici e i tecnici di laboratorio. Mediante la radiografia potrebbe essere difficile distinguere le lesioni provocate dai funghi sistemici da quelle causate dalla tubercolosi o dai neoplasmi, sia benigni che maligni. 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.³⁻⁷

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.¹⁸

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

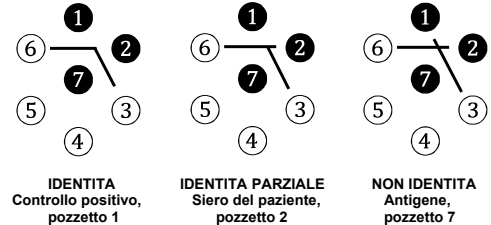
Il solo utilizzo del test per l'immunodiffusione, coccidioides "F" (IDCF) per la sierodiagnosi della coccidioidomicosi non è consigliato, in quanto in genere viene rilevato solo l'anticorpo IgG. Se utilizzato con il sistema di prova al lattice dei coccidioides per gli anticorpi *C. imm.*, il 93% dei pazienti affetti da coccidioidomicosi attiva risulta positivo a uno o entrambi i test (CL o ID). Inoltre, l'anticorpo IgM dei *Coccidioides immitis* può essere rilevato utilizzando il set Meridian del siero di riferimento e l'antigene IDTP dei coccidioides.^{4-6, 12}

PRINCIPI BIOLOGICI

Il sistema di immunodiffusione dei coccidioides 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.¹⁰⁻¹²

È possibile eseguire un test di "identità" degli antigeni o degli anticorpi posizionando un pozzetto di prova della sostanza in questione accanto ai pozzetti di un sistema noto. Se i composti dell'antigene o dell'anticorpo sono identici, le linee di precipitina formano una linea continua di identità con il sistema noto. Sono possibili anche reazioni di identità parziale o di non identità (vedere figura 1).

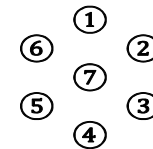
Figura 1. Identificazione delle bande di immunodiffusione



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 ne 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 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.

L'anticorpo IgM viene rilevato dall'antigene "TP", mentre l'anticorpo IgG viene rilevato dall'antigene "F". I risultati ottenuti con l'antigene "TP" sono paralleli a quelli della precipitina in provetta e delle prove al lattice, mentre i risultati ottenuti con l'antigene "F" sono simili a quelli osservati con la fissazione del complemento.^{14, 16, 18}

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- Antigene:** gli antigeni dei coccidioides sono disponibili nei formati da 1 mL e 5 mL. Gli antigeni disponibili sono costituiti da filtrati culturali purificati contenenti l'antigene "F" o "TP" dei *Coccidioides immitis* con una concentrazione pari a 100 unità/mL.* Gli antigeni contengono timerosal con una concentrazione finale pari a 1:10.000 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.
- Sieri di controllo:** il siero di controllo liofilizzato anti-coccidioides viene fornito in formato da 1 mL. Il siero di controllo contiene siero di capra, coniglio o umano con anticorpi diretti contro l'antigene "F" o "TP" di *C. immitis* (vedere la sezione **PRECAUZIONI**). Questi sieri di controllo positivo vengono conservati con azotidrato di sodio allo 0,1%. Si consiglia di prestare particolare attenzione al fine di evitare contaminazioni da microbi.
- Piastre di immunodiffusione:** vengono fornite 12 piastre ID. Se su ogni piastra si eseguono i test di quattro sieri, il materiale fornito è sufficiente per eseguire il test del siero di 48 pazienti. È possibile ottenere le piastre ID ordinandole con il numero di catalogo Meridian 101012. Le piastre di immunodiffusione contengono agarosio allo 0,9% in soluzioni tampone glicina/fosfato a pH 7,4 ± 0,2.

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

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

MATERIALI E APPARECCHIATURE NECESSARI MA NON FORNITI

- 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 rimangano 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.

PRECAUZIONI

- Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
- Il siero di controllo e i campioni dei pazienti possono contenere agenti infettivi. Il siero di controllo può contenere siero umano le cui analisi hanno evidenziato l'assenza di HbsAg e anticorpi HIV. Tuttavia, nessun test è in grado di garantire con assoluta certezza che il sangue umano non trasmetta HIV, epatite o altri agenti infettivi, pertanto i campioni dei pazienti, il siero di controllo, le piastre ID utilizzate e altri materiali potenzialmente pericolosi devono essere maneggiati al livello 2 di biosicurezza come consigliato nel manuale CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
- 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 sciacquare 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 dei coccidioides vanno conservati a una temperatura di 2-8 C. Congelare e scongelare ripetutamente gli antigeni è dannoso per gli antigeni stessi. Si consiglia di evitare anche un eccessivo calore, ovvero una temperatura superiore a 60 C. Se conservati a 2-8 C gli antigeni rimangono stabili per almeno 24 mesi dalla data di produzione.

Alle stesse condizioni anche, i sieri di controllo positivi sono stabili allo stato liofilizzato per un minimo di 24 mesi dalla data di produzione. 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.

Le piastre di immunodiffusione vengono imballate singolarmente e, se non aperte e conservate a una temperatura di 2-8 C, si conservano per un minimo di 18 mesi. Se le confezioni vengono aperte ed è necessario conservare le piastre prima di utilizzarle, occorre riporle in un contenitore umido a chiusura ermetica per evitare che si asciugano. Si consiglia di utilizzare un contenitore di plastica richiudibile dotato di una piccola spugna o di un panno umido.

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 timorol 1:10.000 o con azotidato di sodio allo 0,1%. È possibile ottenere una maggiore sensibilità durante l'esecuzione del test dell'anticorpo "TP" utilizzando un siero del paziente con una concentrazione di 8:1.¹³⁻¹⁶ Questa procedura può essere completata tramite la pervaporazione o l'utilizzo del filtro di membrana del taglio molecolare di 125000 (ad esempio, Amicon™ B-125 o equivalenti). Mentre sono disponibili diverse strategie per la pervaporazione, il siero deve essere inserito in un tubo da dialisi, asciugato con aria o riscaldato con un essiccatore portatile finché non si ottiene la corretta riduzione del volume.
- All'interno di uno studio clinico, è stato raggiunto un aumento della sensibilità del 15% nel momento in cui i campioni erano concentrati dalla pervaporazione e lasciati prediffondere per du ore prima di aggiungere l'antigene (comunicazione personale di Pappagianis, et al.).

PROCEDURA DEL TEST

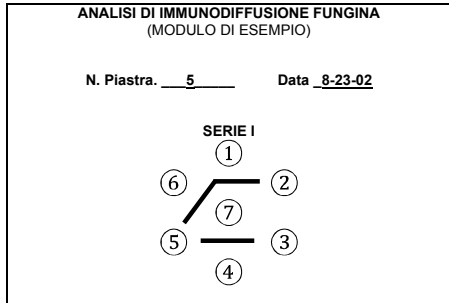
A. Ricostituzione del siero di controllo positivo.

- Utilizzando una pipetta da 1 mL o una siringa da tubercolina, aggiungere alle fiale del siero di controllo 0,95 mL di acqua reagente.
- 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 la sezione 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 dei coccidioides), riempire i pozzetti del siero di controllo (1 e 4) di una piastra ID.

Figura 3.



- Registrare il nome, la data e/o il numero di laboratorio del primo paziente nella seconda riga della colonna di sinistra (figura 4) del modulo di registrazione (fornito solo con il sistema di immunodiffusione dei coccidioides) e riempire il pozzetto 2 con il siero del paziente, utilizzando un tubo capillare. Ripetere questa procedura per ulteriori sieri nei pozzetti 3, 5 e 6, utilizzando un tubo capillare nuovo per ogni paziente.
- Utilizzando un tubo capillare nuovo, riempire il pozzetto centrale con l'antigene dei coccidioides.
- 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. Si osservi che per alcuni sieri le bande sono visibili già dopo 3-6 ore; tuttavia sarà necessario confermare i risultati degli altri sieri successivamente.
- Trascorse le 24 ore, leggere e registrare le bande ID nel modulo di analisi (figura 4) (vedere la sezione Lettura del test). Se a questo punto non sono ancora state osservate reazioni, è necessario elaborare un rapporto temporaneo. I risultati positivi devono essere immediatamente annotati.

Figura 4.

N. Pozzetto	TEST	
1. Siero di Controllo	Contr. Coccoi	
2. CARTER, R. 3287	NEGATIVO	
3. LESTER, C. 2519	NEGATIVO	
4. Siero di Controllo	Contr. Coccoi	
5. BARNES, T. 1362	NEGATIVO	Trascorse 24 ore di incubazione, disegnare le bande osservate nel diagramma dei pozzetti sopra riportato e registrare il numero di bande negli spazi presenti.
6. HASKAMP, D. 1154	I-BAND	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.
7. Antigene	Coccidioidina	

(Nome, Data, N: Lab, ecc.)

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

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 congiuntura 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.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Una banda di identità con controllo positivo indica l'anticorpo dei *Coccidioides immitis* del paziente. Reazioni di identità parziale sono considerate positive per l'anticorpo. Reazioni di non identità sono considerate test negativi.¹¹

CONTROLLO DI 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

La presenza di anticorpi dell'antigene "F" indica infezioni attive o recenti (fino a 1 anno). Il test ID risulta in genere positivo fino a 4 settimane in seguito all'infezione e rimane tale per tutto il corso della malattia.

La presenza di anticorpi dell'antigene "TP" indica infezioni attive o recenti. Si tratta principalmente degli anticorpi IgM che compaiono entro alcuni giorni dall'infezione. Il test ID risulta positivo entro una settimana dall'infezione e ritorna negativo entro pochi mesi.

Il test di fissazione del componente e la prova al lattice possono fornire ulteriori importanti informazioni in merito allo stato del paziente.⁴⁻⁶

È possibile rilevare la presenza di reazioni crociate 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^{9, 18, 21} (vedere la sezione LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA). Anche le reazioni di identità parziale sono importanti indicatori della probabile presenza di malattie. Se la malattia è causata da un agente micotico diverso da quello per il quale è stato eseguito il test, è possibile osservare reazioni di non identità. Tuttavia, una reazione di non identità rappresenta un test negativo per l'organismo ricercato.

Se si osserva un'attività relativa ai *Coccidioides immitis*, si consiglia di confermare l'esistenza dell'organismo con una coltura.

LIMITAZIONI 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.²⁰ È possibile osservare reazioni crociate in pazienti affetti da infezioni causate da altri funghi sistemici. Mentre questi possono essere facilmente distinti dalle linee di identità prodotte nei confronti della coccidioidina, la loro vera identità non verrà rilevata in un sistema limitato a un solo antigene.

FRANÇAIS

COCCIDIODES "F" ANTIGEN FOR FUNGAL IMMUNODIFFUSION

[REF]

100401, 100405,
100801, 103001, 103101

[IVD]

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Les réactifs d'immunodiffusion de coccidioides de Meridian Bioscience sont des préparations purifiées et standardisées, destinées à l'identification in vitro d'anticorps de précipitines de *Coccidioides immitis* (*C. Imm.*). Les réactifs disponibles détectent les anticorps "TP" (précoces) ou "F" (tardifs). Leur utilisation avec la méthode de diffusion double d'Ouchterlony offre des résultats optimaux.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Coccidioides immitis est l'un des agents pathogènes de mycoses profondes. Cette maladie est surtout localisée dans le sud-ouest des Etats-Unis, mais l'extension des voyages augmente les risques d'infection dans les régions non endémiques.

L'infection présente un défi diagnostique aussi bien pour les médecins que pour les biologistes. Radiographiquement, les lésions provoquées par des mycoses systémiques sont difficiles à distinguer les unes des autres; il est également difficile de les distinguer des lésions tuberculeuses et des néoplasmes (bénins et malins). Les symptômes sont souvent asymptomatiques et peuvent ressembler aux symptômes associés 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.³⁻⁷ Le recours à la sérologie est souvent le seul moyen d'orienter le traitement, de suggérer un pronostic ou de déboucher sur la sélection de techniques de diagnostic plus définitives, telles que la culture intensive ou la biopsie. Par ailleurs, la sérologie quantitative, telle que le test de fixation du complément, peut fournir des informations essentielles sur les effets de la chimiothérapie.¹⁸

Les systèmes d'immunodiffusion de coccidioides représentent des outils d'évaluation fiables et simples à utiliser en cas de mycoses suspectées. Ces procédures permettent de tester des sérums anticomplémentaires, et fournissent également des données de spécificité sur les réactions de fixation de complément. N'exigeant aucun matériel coûteux et réalisable par tout laboratoire, ces systèmes constituent une excellente méthode de dépistage.

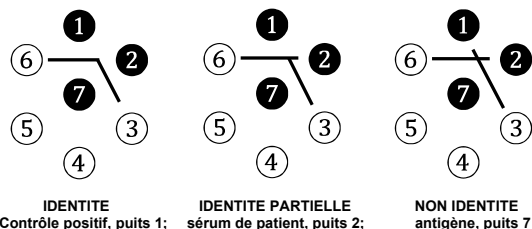
Pour le sérodiagnostic de la coccidioidomycose, il est recommandé de ne pas recourir uniquement au test d'immunodiffusion de coccidioides "F" (IDCF), qui ne détecte généralement que les anticorps IgG. Lorsque ce test est associé au Système d'agglutination au latex de coccidioides pour les anticorps *C. imm.*, 93% des patients atteints de coccidioidomycose présentent une réaction positive à l'un des tests ou aux deux (CL ou ID). En outre, l'anticorps IgM dirigé contre *Coccidioides immitis* peut être détecté à l'aide du Kit de sérum de contrôle et de l'antigène IDTP Coccidioides de Meridian.^{4-6, 12}

PRINCIPE DU TEST

Les systèmes d'immunodiffusion de coccidioides de Meridian Bioscience sont fondés sur le principe de la diffusion double développée par Oudin et Ouchterlony. Celle-ci consiste à placer dans deux puits distincts creusés dans un gel d'agarose, un anticorps et l'antigène soluble correspondant, puis à laisser les protéines se diffuser vers l'extérieur. Entre les deux puits, un gradient de concentration de chacun des constituants de réaction est établi, qui s'échelonne entre un excès d'antigène près du puits de l'anticorps et un excès d'anticorps près du puits de l'antigène. Une ligne de précipitines visible se forme au point d'équivalence.¹⁰⁻¹²

Un test d'identité des antigènes ou des anticorps peut être effectué en plaçant un puits de test de la substance en question près des puits d'un système de référence connu. Si les complexes antigènes-anticorps sont identiques, les lignes de précipitation forment une ligne d'identité continue avec le système de référence connu. Il est également possible d'obtenir des réactions d'identité partielle et de non-identité (voir Figure 1).

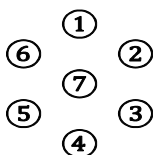
Figure 1. Identification des bandes d'immunodiffusion



En cas de présence de composants communs entre les antigènes (ou anticorps) ayant par ailleurs des composants spécifiques à chacun d'eux, on observe une réaction d'identité partielle. L' "éperon" représente les composants spécifiques. Si les complexes antigènes-anticorps n'ont aucun déterminant commun et sont donc totalement différents, les lignes de précipitation se coupent mutuellement (X). Il s'agit d'une réaction de non-identité.

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; les réactions d'identité apparaissent donc clairement. (Voir Figure 2)

Figure 2. Configuration des puits d'antigène et de serum sur une plaque d'immunodiffusion.



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

L'antigène "TP" détecte l'anticorps précoce (IgM), tandis que l'antigène "F" détecte l'anticorps tardif (IgG). Les résultats obtenus avec l'antigène "TP" sont analogues à ceux des tests au latex et d'immunoprécipitation; les résultats obtenus avec l'antigène "F" sont similaires à ceux que l'on observe avec le test de fixation de complément.^{14, 16, 18}

MATERIEL FOURNI

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

- Antigène:** Les antigènes de coccidioides sont disponibles en flacons de 1 et 5 mL. Les antigènes disponibles sont constitués de filtrats de culture purifiés contenant l'antigène "F" ou "TP" de *Coccidioides immitis* à des concentrations de 100 unités/mL.* Les antigènes contiennent le conservateur thimésoral à une concentration finale de 1:10000. Les précautions d'usage doivent être prises pour éviter tout risque de contamination microbienne. *Ces unités correspondent à des normes Meridian internes uniquement destinées à garantir la reproductibilité des concentrations d'antigène d'un lot à l'autre.
- Sérums de contrôle:** Le sérum de contrôle lyophilisé anti-coccidioides est fourni en flacon de 1 mL. Il est constitué de sérum humain, de lapin ou de chèvre avec anticorps dirigés contre l'antigène "TP" ou "F" de *C. immitis* (voir **PRECAUTIONS D'EMPLOI**). Ces sérums de contrôle positifs contiennent 0,1% d'azide de sodium. Les précautions d'usage doivent être prises pour éviter tout risque de contamination microbienne.
- Plaques d'immunodiffusion:** Le système comporte douze plaques ID. Sur une base de quatre sérums testés par plaque, les composants fournis permettent de tester les sérums de 48 patients. Des plaques ID supplémentaires peuvent être commandées (catalogue Meridian n° 101012). Les plaques d'immunodiffusion se composent d'agarose à 0,9% dans tampon phosphate/glycine, pH 7,4 ± 0,2.

Remarque: Les récentes avancées sur la formulation des plaques éliminent la nécessité d'utilisation du liquide intensificateur de bande d'immunodiffusion (Immunodiffusion Band Intensifying Fluid).

Remarque: Meridian Bioscience produit des réactifs de sérologie fongique de haute qualité selon des normes strictes. Meridian Bioscience, Inc. ne garantit pas la performance des tests réalisés avec des antigènes, des sérums de contrôle et des plaques autres que ceux fournis. L'utilisateur assume toute responsabilité en cas de modification quelconque apportée aux procédures décrites dans ce document.

MATERIEL REQUIS, NON FOURNI

- Eau analytique purifiée.
- Chambre humide: Tout récipient adéquat, telle que boîte de Pétri, boîte plastique ou pot en verre avec couvercle hermétique contenant un papier filtre ou une serviette en papier humide convient, du moment que les plaques sont stationnaires, qu'elles reposent à plat et qu'elles sont hydratées pendant la période d'incubation.
- Lecture à fond noir. Des lecteurs de plaque à fond noir sont disponibles dans le commerce. Il est toutefois possible de créer un système satisfaisant avec les moyens du bord. Il suffit pour cela de couvrir le réflecteur de protection de l'ampoule d'une lampe haute intensité avec un papier noir dans lequel on découpe un petit orifice de 1 à 2 cm de diamètre. Une autre solution consiste à tenir la plaque à 45 degrés devant toute source de lumière vive indirecte.

PRECAUTIONS

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- Les échantillons des patients de sérums de contrôle peuvent contenir des agents infectieux. Le sérum de contrôle peut contenir du sérum humain ayant été soumis au test de HBSAg et d'anticorps au VIH, dont les résultats se sont avérés négatifs. Aucun test ne peut toutefois apporter l'assurance formelle de la non-transmission du VIH, du virus des hépatites ou d'autres agents infectieux par le sang humain. En conséquence, les échantillons des patients, les sérums de contrôle, les plaques ID et les autres composants présentant un risque potentiel doivent être manipulés conformément aux normes de biosécurité 2 en conformité avec le Centre épidémiologique (CDC) ou le manuel des instituts nationaux de la santé aux Etats-Unis (NIH).
- Les sérums de contrôle contiennent de l'azide de sodium (conservateur). L'accumulation de ce produit chimique dans les tuyauteries métalliques pouvant présenter un risque d'explosion, il est recommandé de placer dans un récipient de déchets adéquat ou de vider dans un évier (en faisant couler de l'eau en abondance) tout excédent de sérum de contrôle.

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

Les antigènes de coccidioides doivent être réfrigérés à 2-8 C. Les congélations et décongélations successives risquent de les dégrader, de même que les températures extrêmes (supérieures à 60 C). Conservés à 2-8 C, les antigènes demeurent stables pendant au moins 24 mois à partir de la date de fabrication.

Les sérums de contrôle positifs demeurent stables sous l'état lyophilisé pendant 24 mois minimum à partir de la date de fabrication. Une fois reconstitués, il est recommandé de les subdiviser et de les congeler s'ils ne doivent pas être utilisés dans un délai d'un mois. Conservés à -20 C, ils ont une durée de vie de neuf mois minimum. Eviter les congélations et décongélations répétées. Lorsque les sérums de contrôle positifs sont utilisés, l'exposition à la température ambiante doit être aussi brève que possible.

Les plaques d'immunodiffusion sont emballées individuellement. En l'état, elles peuvent être conservées à 2-8 C pendant 18 mois au minimum. Une fois l'emballage ouvert, si les plaques doivent être conservées avant utilisation, il convient de les placer dans un récipient humide à couvercle hermétique pour éviter toute dessiccation. Un récipient en plastique hermétiquement clos contenant une petite éponge ou serviette humide constitue une solution idéale.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Le sérum stérile obtenu à partir du sang du patient produit les meilleurs résultats.
- Dans le cas d'un traitement différé, l'échantillon peut être réfrigéré 72 heures. Les échantillons peuvent également être conservés 6 mois à -20 C sans perte d'activité, à condition qu'ils ne soient pas dégelés, puis recongelés. Si les échantillons doivent être acheminés d'un laboratoire à un autre, il est recommandé de les maintenir à une température de 2-8 C. Au besoin, les spécimens peuvent être conservés avec du thimésoral à des concentrations de 1:10000 ou de l'azide de sodium à 0,1%.
- La concentration du sérum du patient (environ 8:1) produit de meilleurs résultats lors des tests d'anticorps "TP"¹³⁻¹⁶. A cet effet, on peut recourir à la pervaporation ou à l'utilisation d'un filtre membranaire d'arrêt de poids moléculaire de 125000 (Amicon™ ou équivalent). Plusieurs méthodes de pervaporation sont disponibles, mais le sérum peut tout simplement être placé dans un tube de dialyse court, puis séché à l'air ou réchauffé délicatement avec un séchoir à main jusqu'à obtention de la réduction de volume adéquate.
- Une étude clinique limitée a révélé une augmentation de 15% de la sensibilité sur les spécimens concentrés par pervaporation, puis laissés à prédiffuser pendant deux heures avant ajout de l'antigène. (Pappagiania, et al., personal communication)

PROCEDURE DE TEST

- Reconstitution du sérum de contrôle positif.**
 - A l'aide d'une pipette 1 mL ou d'une seringue tuberculique, ajouter 0,95 mL d'eau analytique purifiée aux flacons de sérum de contrôle.
 - Agiter légèrement le fond des flacons afin de mélanger.
 - Laisser les flacons à température ambiante pendant 1 heure en les retournant de temps en temps pour mélanger. (Ne pas secouer.)
 - Si, lors de la première utilisation, le sérum paraît inactif, il est possible que le temps de réaction n'ait pas été suffisant. Dans ce cas, répéter le test.
 - Subdiviser et congeler le sérum de contrôle qui ne sera pas utilisé dans un délai d'un mois (voir **DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE**).
- Procédure de test**
 - Se référer aux figures 2, 3 et 4 pour identifier la configuration des puits.
 - Remplir, à l'aide d'une pipette capillaire fournie (système d'immunodiffusion de coccidioides Meridian uniquement), les puits du sérum de contrôle (1 et 4) d'une plaque ID.

Figure 3

ANALYSE D'IMMUNODIFFUSION FUNGIQUE
(FORMULAIRE EXEMPLE)

Plaque No. 5 Date 8-23-02

SERIE I

Figure 3 illustre un exemple de formulaire d'analyse d'immunodiffusion fongique. Le formulaire indique le numéro de plaque (5) et la date (8-23-02). Le diagramme montre la disposition des puits (numérotés 1 à 7) sur la plaque.

- Noter le nom, la date et/ou le numéro de laboratoire du premier patient sur la ligne 2 de la colonne de gauche (Figure 4) du formulaire de compte-rendu (inclus dans le système d'immunodiffusion de coccidioides Meridian uniquement), puis remplir, à l'aide d'un tube capillaire, le puits du sérum du patient (2). À l'aide d'un tube capillaire distinct pour chaque patient, répéter cette procédure pour les sérums additionnels dans les puits 3, 5 et 6.
- À l'aide d'un nouveau tube capillaire, remplir les puits central d'antigène coccidioides.
- Numéroter et dater la plaque ID et le formulaire d'analyse.
- Placer la plaque ID dans une chambre humide et laisser incuber 24 heures à température ambiante. Remarque: les bandes de certains sérums peuvent apparaître en quelques heures (3 à 6 h), mais les résultats de autres sérums devront être confirmés plus tard.
- La période de 24 heures étant écoulée, lire et enregistrer les bandes ID sur le formulaire d'analyse (Figure 4) (voir Lecture des résultats). Si aucune réaction d'identité n'est observée, un compte-rendu partiel doit être établi. Les résultats positifs doivent être communiqués immédiatement.

Figure 4

No. de Puits	TEST
1.	<u>Sérum de Contrôle</u> Cont. Cocci
2.	<u>CARTER, R. 3287</u> NEGATIF
3.	<u>LESTER, C. 2519</u> NEGATIF
4.	<u>Sérum de Contrôle</u> Cont. Cocci
5.	<u>BARNES, T. 1362</u> NEGATIF
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u> I-BAND
7.	<u>Antigène</u> Coccidioidine

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

- Il est recommandé de confirmer un résultat négatif en poursuivant la période d'incubation pendant 48 heures. Etablir un compte-rendu définitif à l'issue de cette période.

LECTURE DES RESULTATS

Une source de lumière vive indirecte sur fond noir facilite l'observation des bandes de précipité. Ainsi, une plaque peut être tenue près de l'abat-jour d'une lampe haute intensité dont le faisceau lumineux est dirigé vers le bas sur une surface de travail noire.

Une source de lumière vive directe peut également être utilisée si la plaque est tenue dans le faisceau lumineux à un angle de 45 degrés sur fond noir. Des lampes à faisceau de lumière indirecte sur fond noir destinées spécifiquement à l'examen des plaques d'immunodiffusion sont disponibles dans le commerce.

Il convient de prêter une attention particulière à l'orientation des bandes produites par le sérum du patient, par rapport aux bandes de contrôle. La jonction nette des bandes indique une réaction d'identité. Lorsque les titres d'anticorps du patient sont faibles, on observe uniquement un léger infléchissement de la bande de contrôle vers une position située devant le puits du patient. Le test doit être renouvelé si l'on n'observe aucune réaction entre le contrôle positif et l'antigène.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Une bande d'identité avec le contrôle positif indique des anticorps du patient contre *Coccidioides immitis*. Des réactions d'identité partielles déterminent également un résultat positif. Les réactions de non-identité indiquent un test négatif.¹¹

CONTROLE DE QUALITE

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

Chaque antigène est fourni avec un sérum de contrôle positif afin de permettre à l'utilisateur d'effectuer un contrôle qualité sur chaque test exécuté. Un contrôle négatif apparaît généralement parmi les patients testés. Les résultats des contrôles obtenus doivent être consignés dans un journal réservé à cet effet, conformément à la réglementation en vigueur; de plus, ces dispositions préservent la haute qualité des tests. **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

Des anticorps contre l'antigène "F" indiquent une infection active ou récente (dans l'année). Le test d'immunodiffusion est généralement positif dans un délai de 4 semaines après l'infection, et il demeure positif pendant toute la durée de la maladie clinique active.

Des anticorps contre l'antigène "TP" indiquent une infection active récente. Il s'agit essentiellement d'anticorps IgM qui apparaissent dans les jours qui suivent l'infection. Ce test d'immunodiffusion est généralement positif dans un délai d'une semaine après l'infection, et redevient négatif après quelques mois.

Les tests au latex et de fixation du complément apportent des informations complémentaires importantes sur l'état du patient.^{4,6}

Des réactions croisées pouvant être observées chez les patients hébergeant d'autres mycoses systémiques (particulièrement *H. cap.*), il convient d'apporter un soin particulier à la lecture des réactions d'identité^{9, 18, 21} (voir **LIMITES DU TEST**). Les réactions d'identité partielles sont d'importants indicateurs de maladie probable. Des réactions de non-identité peuvent être observées lorsqu'un agent mycotique autre que celui faisant l'objet du test est à l'origine de l'état infectieux. Une réaction de non-identité constitue toutefois un test négatif de l'organisme en question.

En cas d'observation d'activité contre *Coccidioides immitis*, il est essentiel de tenter de démontrer l'organisme en culture pour confirmer le résultat.

LIMITES DU TEST

Le taux élevé de tests sérologiques négatifs observé parmi certains cas démontrés en culture limite la valeur de prédiction d'un test négatif.²⁰ Des réactions croisées ont été observées chez des patients porteurs d'infections occasionnelles par d'autres champignons systémiques. Si ces réactions se distinguent aisément des lignes d'identité produites contre *Coccidioides immitis*, leur véritable identité n'apparaît pas dans un système limité à un antigène.

ESPAÑOL

COCCIDIOIDES "F" ANTIGEN FOR FUNGAL IMMUNODIFFUSION

REF

100401, 100405,
100801, 103001, 103101

IVD

Dispositivo medico para diagnóstico in vitro

Rx Only

USO INDICADO

Los reactivos de los Sistemas para la Detección de *Coccidioides* por Inmunodifusión de Meridian Bioscience son preparaciones estandarizadas y purificadas para la determinación *in vitro* de anticuerpos precipitantes contra *Coccidioides immitis* (*C. immitis*). Hay reactivos disponibles para la detección tanto de anticuerpos tempranos ("TP") como de tardíos ("F"). Estos reactivos han sido optimizados para uso con la técnica de doble difusión de Ouchterlony.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Coccidioides immitis es uno de los agentes causales de micosis profundas. A pesar de que se encuentra más bien localizado en la región sudeste de los EE.UU., el mejoramiento de los medios de transporte ha traído un aumento en la posibilidad de infección de los individuos que visitan esta región.

La coccidioidomycosis presenta un reto para el diagnóstico al médico y al técnico de laboratorio. Las lesiones radiográficas producidas en las micosis sistémicas pueden ser difíciles de diferenciar entre sí de lesiones tuberculosas y de neoplasmas (benignos y malignos). Con frecuencia, los síntomas son indistinguibles y pueden asemejarse a los de varios tipos de neumonías, sarcoidosis, cánceres y otras enfermedades.^{1,2} La detección de los organismos mediante cultivos y estudios histológicos, aún después de intentos repetidos, puede ser difícil.^{3,7}

Con frecuencia, las serologías ofrecen la única vía disponible para formular un diagnóstico preliminar. Los resultados de serologías pueden sugerir el pronóstico de la enfermedad con el uso de otras técnicas más definitivas, tales como cultivos o biopsias. Además, las técnicas de serología cuantitativa, por ejemplo la prueba de fijación de complemento, pueden proporcionar información importante con respecto a los efectos de la quimioterapia.¹⁸

Los Sistemas para la Detección de *Coccidioides* por Inmunodifusión son 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, puesto que es simple y no requiere de equipos costosos, puede ser ejecutada en cualquier laboratorio, y proporciona un excelente método de diagnóstico.

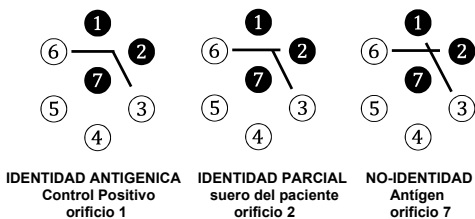
No se recomienda para el diagnóstico serológico de la coccidioidomycosis la utilización aislada de la prueba de Inmunodifusión *Coccidioides* "F" (IDCF), ya que por lo general tan solo puede detectar anticuerpo de tipo IgG. Cuando ésta se utilizó en combinación con el Sistema de Aglutinación con Latex para *Coccidioides* para la detección de anticuerpos contra *C. immitis*, el 93% de los pacientes con coccidioidomycosis activa dieron resultado positivo en uno o en ambas pruebas (CL ó ID). Además, es posible detectar anticuerpo de tipo IgM contra el *Coccidioides immitis* mediante el antigeno para *Coccidioides* IDTP y el Set de Sueros de Control de Meridian.^{4,6, 12}

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El Sistema para la Detección de *Coccidioides* por Inmunodifusión de Meridian Bioscience está basado en el principio de doble difusión descrito por Oudin y Ouchterlony. Un anticuerpo y su antígeno 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 antígeno cerca del orificio de anticuerpo, hasta exceso de anticuerpo cerca del orificio de antígeno. En el punto de equilibrio entre los gradientes se forma una curva de precipitación visible.¹⁰⁻¹²

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 (vea la Figura 1).

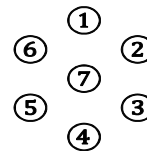
Figura 1. Identificación de las bandas de inmunodifusión



Una reacción de identidad parcial ocurre cuando ciertos antígenos o anticuerpos son idénticos y otros no lo son. La "espuela" 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 detectables (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 de pacientes: orificios 2, 3, 5 y 6; Antígeno: orificio 7.

El antigéno "TP" detecta los anticuerpos tempranos de tipo IgM. El antigéno "F" detecta los anticuerpos tardíos de tipo IgG. Los resultados obtenidos con el antigéno "TP" son equivalentes a aquellos obtenidos con las pruebas de látex y precipitina, mientras que los obtenidos con el antigéno "F" siguen el mismo curso que aquellos obtenidos en la prueba de fijación de complemento.^{14, 16, 18}

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

- Antigéno:** los antígenos de *Coccidioides* están disponibles en frascos de 1,0 y 5,0 mL. Los antígenos disponibles consisten de filtrados de cultivo purificados que contienen ya sea el antigéno "TP" o el antigéno "F" de *Coccidioides immitis* a una concentración de 100 unidades por mL. Los antígenos contienen timosal como agente preservante en una proporción de 1:10.000. Sin embargo, se debe tener cuidado al manejarlos para evitar la contaminación microbiana de los mismos. *Estas unidades constituyen estándares internos de Meridian, diseñados únicamente para garantizar la reproducibilidad de la concentración del antigéno entre los distintos lotes.
- Suero Control:** el Suero de Control liofilizado anti-*Coccidioides* es provisto en frascos de 1,0 mL. El Suero Control contiene suero de cabra, conejo o humano con anticuerpos dirigidos ya sea contra el antigéno "TP" o el antigéno "F" de *C. immitis* (ver **PRECAUCIONES**). Estos sueros de Control Positivo están preservados con azida de sodio al 0,1%. Sin embargo, se debe tener cuidado al manejarlos para evitar la contaminación microbiana de los mismos.
- Placas para inmunodifusión:** Se proporcionan doce placas para ID con el kit. Cuando se analizan cuatro sueros por placa, se suministran suficientes materiales para realizar 48 determinaciones de sueros de pacientes. Pueden ordenarse placas adicionales haciendo un pedido del artículo No. 101012 del Catálogo de Meridian. Las placas para inmunodifusión consisten de agarosa al 0,9% en un tampón de glicina y fosfato a un pH de 7,4 ± 0,2.

Nota: los avances recientes en la formulación de las placas eliminan la necesidad de usar el fluido intensificador de las bandas de inmunodifusión.

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 Y EQUIPO NECESARIOS PERO NO PROPORCIONADOS

- Aqua de calidad indicada para reactivos.
- 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.
- 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. De otro modo, 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.

PRECAUCIONES

- Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
- Las muestras de pacientes y los sueros de control pueden contener agentes infecciosos. El suero de control puede contener suero humano que fue analizado para determinar la presencia del antigéno australiano (HbsAg) y el anticuerpo contra el VIH y cuyo resultado fue negativo para ambas pruebas. No obstante, no existe método alguno que pueda garantizar que el suero humano no vaya a transmitir el VIH, el virus de la hepatitis u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, el suero de los pacientes, el suero control, las placas de inmunodifusión utilizadas y cualquier otro material que represente riesgo biológico deben manipularse siguiendo las pautas de Bioseguridad Nivel 2 recomendadas en el manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" (Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Biomedica) del CDC/NIH.
- Los sueros de control están preservados con azida de sodio. La acumulación de este metal en las tuberías metálicas de los desagües 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 *Coccidioides* deben almacenarse a la temperatura de refrigeración (2-8 C). Si se congelan y descongelan repetidamente, los antígenos pueden dañarse. También deben evitarse temperaturas extremas que superen 60 C. Los antígenos que son almacenados a 2-8 C permanecen estables por lo menos durante 24 meses después de la fecha de manufactura.

Los sueros de Control Positivo permanecen estables en su estado liofilizado como mínimo durante 24 meses después de la fecha de manufactura, si se almacenan a 2-8°C. Una vez reconstituidos, se recomienda dividirlos en alícuotas y congelarlos si no van a ser usados dentro de 30 días. Almacenados a -20 C la viabilidad esperada es como 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. Si el empaque cerrado se almacena a 2-8 C, las placas tienen una viabilidad mínima de 18 meses. Si el envase es abierto y las placas deben almacenarse antes de usarlas, deben guardarse en un recipiente firmemente cerrado, con humedad, para evitar que se sequen. Un recipiente de plástico, resellable, con una pequeña esponja o toalla húmeda es muy adecuado para este fin.

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 a 2-8 C para obtener los mejores resultados. Si es necesario, las muestras pueden preservarse con timosal en una proporción de 1:10.000 o con azida de sodio al 0,1%.
- Al realizar la prueba para anticuerpo contra el antigéno "TP" se puede lograr una mayor sensibilidad concentrando la muestra del paciente en una proporción 8:1.¹³⁻¹⁶ Esta concentración puede conseguirse mediante evaporación o utilizando un filtro de membrana con un límite de peso molecular equivalente a 125000 (por ejemplo Amicon® B-125 o equivalente). A pesar de que existen varias estrategias disponibles para la evaporación, ésta simplemente puede realizarse colocando el suero en una porción corta de tubo para diálisis y secándolo con aire o calentándolo suavemente con un secador de mano hasta alcanzar la reducción de volumen adecuada.

- En un estudio clínico limitado, se observó un aumento en la sensibilidad del 15% cuando las muestras eran concentradas por pervaporación, y se les permitía difundirse durante dos horas antes de la adición del antígeno (comunicación personal de Pappagianis y col.).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

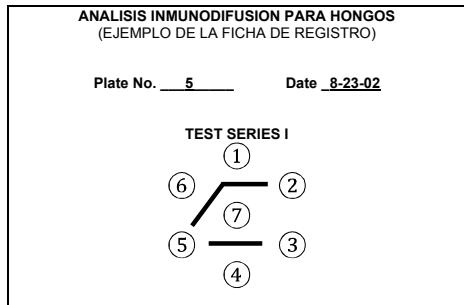
A. Reconstitución del suero de control positivo.

- Con una pipeta de 1,0 mL o una jeringuilla para tuberculina, añada 0,95 mL de agua de calidad analítica para reactivos a los viales de suero de control.
- Para mezclar, golpee suavemente el fondo del vial.
- Deje que reposar los viales a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora, invirtiéndolos de vez en cuando, para mezclar el contenido. No los sacuda.
- Si después de usarlo por primera vez el suero positivo parece inactivo, es decir de una reacción negativa, es posible que el tiempo de reposo no haya sido suficiente. Si este es el caso, repita el test.
- Divida en alícuotas y congele el suero restante que no se usará dentro de 30 días. (ver VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO)

B. Procedimiento del test

- Refiérase a las figuras 2, 3 y 4 para la designación correcta de los patrones en los orificios de la placa del test.
- Con las pipetas capilares proporcionadas (sólo las del Sistema para la Detección de *Coccidioides* por Inmunodifusión) llene los orificios del suero de control (1 y 4) de una placa de ID.

Figura 3.



- Registre el nombre, la fecha y el número de laboratorio del paciente en la línea 2 de la columna izquierda (Figura 4) en la ficha del libro de registros proporcionada con el Sistema para la Detección de *Coccidioides* por Inmunodifusión, y con la ayuda de un tubo capilar llene el orificio 2 de cada con el suero del paciente. Usando un tubo capilar nuevo para cada paciente, repita este procedimiento para los demás sueros en los orificios 3, 5 y 6.
- Con un tubo capilar nuevo llene el orificio del medio con el antígeno de *Coccidioides*.
- Numere y ponga la fecha en la placa para ID y en la ficha del libro de registro del test.
- Coloque la placa para ID en una cámara húmeda e incube a temperatura ambiente durante 24 horas. Nota: en algunos sueros pueden observarse las bandas en tan solo tres a seis horas. Aún así, será necesario confirmar los resultados de los otros antígenos más tarde.
- 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.	TEST	
1.	<u>Suero de control</u>	<u>Control Cocc</u>
2.	<u>CARTER, R. 3287</u>	<u>NEGATIVO</u>
3.	<u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIVO</u>
4.	<u>Suero de control</u>	<u>Control Cocc</u>
5.	<u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIVO</u>
6.	<u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>BANDA I</u>
7.	<u>Antígeno</u>	<u>Coccidioidina</u>

(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.

- 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.

LECTURA DEL TEST

Puede usarse cualquier fuente de luz brillante indirecta para visualizar las bandas de precipitinas. 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 y 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 de 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.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Una banda de identidad con el control positivo indica la presencia del anticuerpo contra *Coccidioides immitis*. Las reacciones de identidad parcial también se consideran positivas para el anticuerpo. Las reacciones de no-identidad se consideran como un resultado negativo del test.¹¹

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

VALORES ESPERADOS

Los anticuerpos dirigidos contra el antígeno "F" indican una infección activa o recientemente pasada (máximo un año). La prueba de inmunodifusión por lo general se hace positiva a las cuatro semanas de infección, y se mantiene positiva durante el transcurso de la enfermedad clínica activa.

Los anticuerpos contra el antígeno "TP" indican infección activa y reciente. Éstos son principalmente anticuerpos de tipo IgM que aparecen durante los primeros días de la infección. Esta prueba de inmunodifusión por lo general es positiva dentro de la primer semana de infección, y revierte a negativa dentro de unos pocos meses.

Las pruebas de aglutinación con látex y de fijación de complemento pueden proporcionar importante información adicional sobre el estado del paciente.⁴⁻⁶

Es posible observar reacciones de inmunidad cruzada en pacientes que han sido infectados por otros hongos productores de micosis sistémicas; especialmente *Histoplasma capsulatum*, por lo cual debe tenerse un cuidado especial al leer reacciones de identidad (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO).^{9, 18, 21} Las líneas de identidad parcial también constituyen indicadores importantes de enfermedad probable, puesto que estas reacciones pueden hacerse aparentes cuando el estado patológico es causado por otro hongo diferente del que se ha analizado.

En caso de observarse actividad contra el antígeno de *Coccidioides immitis*, debe hacerse un intento vigoroso para poder confirmar el diagnóstico mediante el cultivo del microorganismo.

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.²⁰ Las reacciones de reactividad cruzada pueden observarse en pacientes infectados por otros hongos causantes de enfermedad sistémica. A pesar de que las líneas de identidad que se observan en las otras enfermedades sistémicas son fácilmente distinguibles de aquellas producidas contra la coccidioidina, su verdadera identidad no será aparente en un sistema limitado solamente a un antígeno.

DEUTSCH

COCCIDIOIDES "F" ANTIGEN FOR FUNGAL IMMUNODIFFUSION SYSTEMS

REF

100401, 100405,
100801, 103001, 103101

IVD

In-vitro-Diagnostikum

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Die *Coccidioides*-Immunodiffusionsreagenzien von Meridian Bioscience sind standardisierte, gereinigte Präparate für den In-vitro-Nachweis der präzipitierenden Antikörper zu *Coccidioides immitis* (*C. imm.*). Die Reagenzien sind zum Nachweis von entweder "TP" (frühen) oder "F" (späten) Antikörpern vorhanden. Diese Reagenzien wurden für den Gebrauch im Rahmen der Doppeldiffusionsmethode nach Ouchterlony optimiert.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Coccidioides immitis ist eine der Ursachen tiefliegender Mykosen. Obwohl dieser Pilz in den südwestlichen Bundesstaaten der USA relativ lokalisiert ist, wird die Wahrscheinlichkeit einer Infektion bei Personen, die die Region besuchen, durch moderne Transportmittel vergrößert.

Die Erkrankung stellt eine diagnostische Herausforderung an den Arzt und Laborchemiker dar. Röntgenologisch können die von dem systemischen Pilz hervorgerufenen Läsionen schwer voneinander, sowie von tuberkulösen Läsionen und Neoplasmen (sowohl gut – als auch bösartig) zu unterscheiden sein. Die Symptome sind oft unauffällig und können verschiedenen Pneumonien, Sarkoidosen, Karzinomen und anderen Erkrankungen ähnlich sein. Die Organismen sind kulturell und histologisch schwierig nachzuweisen, selbst bei wiederholten Versuchen.^{3,7}

Oft bieten serologische Untersuchungen den einzig verfügbaren Nachweis, um die Behandlung und Prognose vorzuschlagen oder zur Auswahl einer definitiveren diagnostischen Technik wie z.B. einer intensiven Kultur oder Biopsie zu führen. Außerdem kann die quantitative Serologie wie z.B. komplementäre Fixationstestung, wichtige Hinweise auf die Wirkung der Chemotherapie bieten.¹⁸

Die *Coccidioides*-Immunodiffusionssysteme sind einfache, verlässliche Werkzeuge 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 zu erhalten sind. 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.

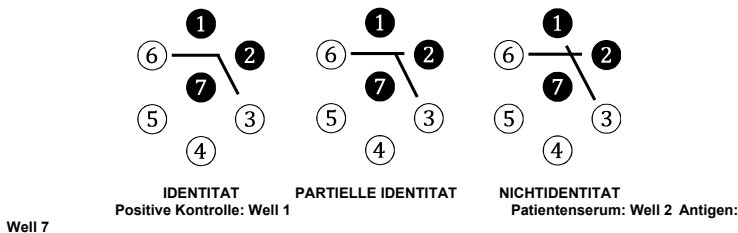
Die Verwendung des Immunodiffusions-*Coccidioides* "F" (IDCF) Tests allein ist nicht zur Serodiagnose der *Coccidioidomykose* empfohlen, da im Allgemeinen nur IgG –Antikörper nachgewiesen werden. Wenn der Test in Verbindung mit dem *Coccidioides*-Latex-Agglutinationssystem für *C. imm*-spezifische Antikörper verwendet wurde, waren 93% der aktiven *Coccidioides*-Patienten in einem oder beiden Tests positiv (CL oder ID). Darüber hinaus können IgM-Antikörper gegen *Coccidioides immitis* mit dem Meridian *Coccidioides*-IDTP-Antigen und Kontrollserumset nachgewiesen werden.^{4-6, 12}

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Das *Coccidioides*-Immunodiffusionssystem 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 Agarose-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 Präzipitatinlinie bildet sich am Äquivalenzpunkt.¹⁰⁻¹²

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 Präzipitatinlinien eine durchgehende Identitätslinie mit dem bekannten System. Partielle und Nichtidentitätslinien sind ebenfalls möglich (siehe Abbildung 1).

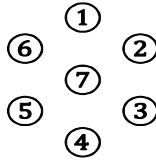
Abbildung 1. Identifizierung von Immunodiffusionsbändern



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

Die Wellmuster der Meridian Immunodiffusionsplatte sind derartig erstellt, dass jedem Patiententestwell ein bekanntes System als Referenz entspricht, so dass Identitätsreaktion einfach zu erkennen sind. (Siehe Abbildung 2)

Abbildung 2. Anordnung der Seren und Antigene im Immundiffusionswellmuster



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

Frühe Antikörper (IgM) werden durch das "TP" Antigen nachgewiesen. Späte Antikörper (IgG) werden durch das "F" Antigen nachgewiesen. Die mit dem "TP" Antigen erhaltenen Resultate verhalten sich parallel zu den Tube Precipitin- und Latextests, während die Ergebnisse, die mit dem "F" Antigen erzielt werden, ähnlich sind wie die, die mit Komplementfixation erreicht werden.^{14, 16, 18}

REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

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

- Antigen:** Coccidioides-Antigene sind zu 1,0 mL und 5,0 mL erhältlich. Die lieferbaren Antigene bestehen aus gereinigten Kulturfiltraten, die entweder das "F" oder das "TP" Antigen von *Coccidioides immitis* zu einer Konzentration von 100 Einheiten pro mL enthalten.* Die Antigene enthalten Thimerosal in einer endgültigen Konzentration von 1:10.000 als Konservierungsmittel. Trotzdem sollte achtgegeben werden, dass mikrobielle Kontamination vermieden wird. *Diese Einheiten sind interne Standards von Meridian und sind lediglich dazu bestimmt, eine Wiederholbarkeit der Antigenkonzentration von Charge zu Charge zu gewährleisten.
- Kontrollserum:** Das Anti-Coccidioides lyophilisierte Kontrollserum ist zu 1,0 mL erhältlich. Das Kontrollserum enthält Ziegen-, Kaninchen- oder menschliches Serum mit Antikörpern, die gegen entweder das "F" – oder das "TP" – Antigen von *C. immitis* gerichtet sind (siehe Vorsichtsmaßnahmen). Diese positive Kontrollserum werden mit 0,1% Natriumazid konserviert. Es sollte achtgegeben werden, dass mikrobielle Kontamination vermieden wird.
- Immundiffusionsplatten:** 12 ID-Platten werden pro Set geliefert. Wenn vier Seren pro Platte getestet werden, stehen genügend Materialien zur Testung von 48 Patientenserum zur Verfügung. ID-Platten können durch Meridian Katalognr. 101012 bestellt werden. Die Immundiffusionsplatten bestehen aus 0,9% Agarose in Glycin/Phosphatpuffer zu einem pH von 7,4 ± 0,2.

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

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

NOTWENDIGE MATERIALIEN UND AUSRÜSTUNG, DIE NICHT IM LIEFERUMFANG ENHALTEN SIND

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

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle Bestandteile des Meridian Coccidioides-Immundiffusionssystems sind nur zur In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Die Patientenproben und das Kontrollserum können infektiöse Stoffe enthalten. Das Kontrollserum kann menschliches Serum enthalten, das auf HBsAg und Antikörper gegen HIV untersucht und für negativ befunden wurde. Allerdings kann kein Test die hundertprozentige Garantie leisten, dass menschliches Blut nicht HIV, Hepatitis oder andere infektiöse Stoffe übertragen kann. Daher sollten Patientenproben, Kontrollserum, gebrauchte ID-Platten und andere potenziell gefährdende Material gemäß Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden, wie es im CDC-/NIH-Handbuch "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors).
- Die Kontrollseren werden mit Natriumazid konserviert. Die Ablagerung dieser Chemikalie in Metallabfuhrrohren kann eine Explosionsgefahr darstellen. Daher wird empfohlen, das überschüssige Kontrollserum entweder einfach in einem angemessenen Abfallbehälter zu entsorgen oder es mit sehr viel Wasser den Abfluss hinunter zu spülen.

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

Coccidioides-Antigene werden am besten zu Kühltemperaturen (2-8 C) gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren schadet diesen Antigenen. Extreme Hitze (mehr als 60 C) ist ebenfalls zu vermeiden. Wenn die Antigene bei Temperaturen von 2-8 C gelagert werden, sind sie mindestens 24 Monate nach dem Herstellungsdatum haltbar.

Die positiven Kontrollseren sind im lyophilisierten Zustand mindestens 24 Monate ab dem Herstellungsdatum haltbar, wenn sie bei 2-8 C aufbewahrt werden. Wenn sie rekonstituiert sind, wird es empfohlen, sie zu aliquotieren und einzufrieren, wenn sie nicht innerhalb eines Monats verwendet werden. Bei -20 C kann eine Mindesthaltbarkeit von neun Monaten erwartet werden. Wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren sollte vermieden werden. Wenn die positiven Kontrollseren in Gebrauch sind, sollte der Zeitraum bei Raumtemperatur so kurz wie möglich gehalten werden.

Immundiffusionsplatten sind einzeln verpackt und sind mindestens 18 Monate haltbar, solange sie ungeöffnet sind und bei 2-8 C gelagert werden. Wenn Plattenpackungen geöffnet werden und die Platten vor Gebrauch gelagert werden müssen sie in einem fest verschlossenen, feuchten Behälter aufbewahrt werden, damit ein Austrocknen verhindert wird. Ein wiederverschließbarer Plastikbehälter mit einem kleinen, feuchten Schwamm oder Tuch ist ideal.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

- Die beste Leistung wird erzielt, wenn steriles Serum aus dem Blut des Patienten gewonnen wird.
- Wenn bei der Bearbeitung der Probe eine Verzögerung entsteht, kann die Probe bis zu 72 Stunden lang eingefroren werden. Proben können bis zu sechs Monate lang bei -20 C eingefroren werden und verlieren ihre Aktivität nicht, vorausgesetzt, dass sie nicht wiederholt aufgetaut und wieder eingefroren werden. Proben, die von einem Labor zum anderen transportiert werden, sollten bei 2-8 C gehalten werden, damit eine optimale Leistung erzielt werden kann. Die Proben können wenn notwendig mit Thimerosal im Verhältnis 1:10.000 oder 0,1 Natriumazid konserviert werden.
- Es kann ein höherer Grad an Sensibilität erzielt werden, wenn der "TP" – Antikörpertest durchgeführt wird, indem das Serum des Patienten auf ungefähr 8:1 konzentriert wird.¹³⁻¹⁶ Dies kann durch Pervaporation oder die Verwendung von einem Membranfilter mit Grenzpunkt bei 125000 Molekulargewicht (z.B. Amicon™ B-125 oder ein Äquivalent) erreicht werden. Obwohl es verschiedene Strategien zur Pervaporation gibt, kann das Serum einfach in ein kurzes Stück Dialyseschlauch gegeben werden und dann luftgetrocknet oder leicht mit einem Handtrockner erwärmt werden, bis die angemessene Volumenverminderung erreicht wird.
- In einer begrenzten klinischen Studie wurde eine 15% ige Erhöhung der Sensibilität beobachtet, wenn die Proben durch Pervaporation konzentriert und zwei Stunden lang prädiffundiert wurden, bevor die Antigene hinzugegeben wurden (Pappagianis et al., persönliche Mitteilung).

TESTDURCHFÜHRUNG

A. Rekonstitution des positiven Kontrollserums

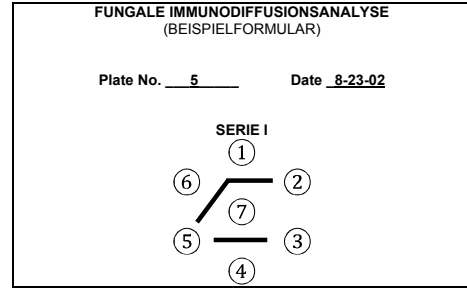
- Mit einer 1,0 mL Pipette oder eine Tuberkulinspritze geben Sie 0,95 mL Wasser von Reagenzqualität in die Kontrollserumfläschchen.

- Schnippen Sie vorsichtig gegen den Boden der Fläschchen, um den Inhalt zu mischen.
- Lassen Sie die Fläschchen ungefähr eine Stunde lang bei Raumtemperatur stehen und drehen Sie sie gelegentlich um, um den Inhalt zu mischen (nicht schütteln!).
- Wenn bei der ersten Verwendung das Serum inaktiv zu sein erscheint, kann es sein, dass die Standzeit nicht lang genug war. In diesem Fall wiederholen Sie den Test.
- Aliquotieren Sie die Menge an Kontrollserum und frieren Sie sie ein, die nicht innerhalb eines Monats verbraucht werden wird. (Siehe HALTBARKEIT UND LAGERUNG)

B. Testverfahren

- Verfahren Sie bitte nach den Abbildungen 2, 3 und 4 zur korrekten Zuweisung des Testwellmusters.
- Mit den mitgelieferten Kapillarpipetten (nur beim Coccidioides-Immundiffusionssystem) füllen Sie die Kontrollserumwells (Nr. 1 und 4) einer ID-Platte.

Abbildung 3.



- Geben Sie den Namen, das Datum und/oder die Labornummer des ersten Patienten auf der zweiten Zeile der linken Spalte (siehe Abbildung 4) des Registrierungsformulars an (nur bei dem Coccidioides-Immundiffusionssystem mitgeliefert) und füllen Sie mit einem Kapillarröhrchen Well 2 mit dem Serum des Patienten. Verwenden Sie ein frisches Kapillarröhrchen für jeden Patienten und wiederholen Sie auf diese Weise das Verfahren für die zusätzlichen Seren in den Wells 3, 5 und 6.
- Mit einem frischen Kapillarröhrchen füllen Sie den Well in der Mitte mit dem Coccidioides-Antigen.
- Nummerieren und datieren Sie die ID-Platte und das Analyseformular.
- Stellen Sie die ID-Platte in eine feuchte Kammer und inkubieren Sie sie 24 Stunden lang bei Raumtemperatur. Hinweis: Bei einigen Seren können Bänder nach nur drei bis sechs Stunden erscheinen. Trotzdem ist es notwendig, die Ergebnisse der anderen Seren später zu bestätigen.
- Nach 24 Stunden lesen Sie die ID-Bänder ab und registrieren Sie sie auf dem Analyseformular (Abbildung 4, siehe auch Ablesen des Tests). Ein Zwischenbericht sollte zu diesem Zeitpunkt erstellt werden, wenn keine Identitätsreaktionen beobachtet werden. Positive Ergebnisse sollten dagegen sofort gemeldet werden.

Abbildung 4.

Well Nr.	TEST	
1. <u>Kontrollserum</u>	<u>Cocci Kontrolle</u>	
2. <u>CARTER, R. 3287</u>	<u>NEGATIV</u>	
3. <u>LESTER, C. 2519</u>	<u>NEGATIV</u>	
4. <u>Kontrollserum</u>	<u>Cocci Kontrolle</u>	Nach 24 stündiger Inkubation zeichnen Sie die beobachteten Bänder in das obige Well-Diagramm ein und tragen Sie die Anzahl der Bänder in die Laerstellen ein.
5. <u>BARNES, T. 1362</u>	<u>NEGATIV</u>	Hinweis: Die Kontrollbänder sind in das obige Well-Diagramm eingetragene worden. Wenn diese Bänder nach 24 Stunden Inkubationszeit auf den Platten beobachtet werden, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.
6. <u>HASKAMP, D. 1154</u>	<u>I-BAND</u>	
7. <u>Antigen</u>	<u>Coccidioidin</u>	

(Name, Datum, Labornr. usw.)

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

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 einem 45° - Winkel gegen einen dunklen Hintergrund gehalten wird. Leuchtkästen, die indirektes Licht gegen einen dunklen Hintergrund bieten und besonders zum Ablesen von Immundiffusionsplatten präpariert sind, sind ebenfalls im Handel erhältlich.

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

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Ein Identitätsband mit der positiven Kontrolle zeigt einen Patienten-Antikörper gegen *Coccidioides immitis* an. Teilweise Identitätsreaktionen werden ebenfalls als Antikörper-positiv betrachtet. Nicht-Identitätsreaktionen werden als negatives Testergebnis gewertet.¹¹

QUALITÄTSKONTROLLE

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

Die Qualitätskontrolle von Seiten des Verbrauchers wird bei jedem Testdurchlauf durch die Einbeziehung eines positiven Kontrollserums für jedes Antigen gewährleistet. Eine negative Kontrolle findet sich meistens unter den verschiedenen getesteten Patienten. Die Ergebnisse, die mit den Kontrollen erzielt werden, sollte in einem angemessenen Logbuch festgehalten werden, um qualitativ hochwertige Testungen zu gewährleisten und die Anforderungen der Aufsichtsbehörden zu erfüllen. Wenn die erwarteten Reaktionen für die Kontrollen nicht beobachtet werden, 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 in (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Distributor.

ERWARTETE WERTE

Antikörper, die gegen das "F" – Antigen gerichtet sind, sind ein Hinweis auf eine aktive oder kürzlich abgelaufene (d.h. bis zu einem Jahr) Infektion. Der ID-Test ist normalerweise innerhalb von vier Wochen nach der Infektion positiv und bleibt in Laufe der klinisch aktiven Erkrankung positiv.

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

Latex- und Komplementfixationstests können wichtige zusätzliche Informationen über den Status des Patienten liefern.⁴⁻⁶

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

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

EINSCHRÄNKUNGEN

Die hohe Rate an negativen serologischen Tests, die unter bestimmten kulturell demonstrierbaren Fällen auftritt, beschränkt den Vorhersagewert eines negativen Testergebnisses.²⁰ Kreuzreaktionen können bei Patienten auftreten, die an Infektionen erkrankt sind, die von anderen systemischen Pilzen hervorgerufen werden. Während diese Pilze einfach von den gegen *Coccidioides immitis* produzierten Identitätslinien zu unterscheiden sind, kann ihre echte Identität nicht in einem System nachgewiesen werden, das auf ein Antigen beschränkt ist.

REFERENCES

- Bauman, DS. and CD. Smith. Comparison of Immunodiffusion and complement fixation tests in the diagnosis of histoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 1975;2:77-80.
- Crowle, AJ. *Immunodiffusion*. Second Edition. Academic Press. New York. 1973; Chapters 1, 2 and 4.
- Heiner, LC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reactions in agar gel. *Pediatrics* 1958;22:616-627.
- Huppert, M. and JW. Bailey. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis 1. The accuracy and reproducibility of the immunodiffusion test which correlates with complement fixation. *Amer. J. Clin. Path.* 1965;44:364-368.
- Huppert, M. and JW. Bailey. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis 11. An immunodiffusion test as a substitute for the tube precipitin test. *Amer. J. Clin. Path.* 1965;44:369-373.
- Kaufman, L. Value of immunodiffusion tests in the diagnosis of systemic mycotic diseases. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1973;3:141-146.
- Kaufman, L. Practical applications of immunologic procedures for the diagnosis of opportunistic fungus infections. In: *Proceedings of the Second International Conference on Opportunistic Fungal Infections*. CC. Thomas Publishing, Springfield. 1975; pp 47-57.
- Kaufman, L. and MJ. Clark. Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion tests in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Appl. Microbiol.* 1974;28:641-43.
- Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gels and the practical application of this phenomenon in the laboratory diagnosis of diphtheria. *Med. Diss. Stockholm*, 1949.
- Ouchterlony, O. *Handbook of Immunodiffusion and Immunelectrophoresis*. 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. *Premiere parse. Ann Inst. Pasteur* 1948;75:30-52.
- Palmer, DF. et al. *Serodiagnosis of Mycotic Diseases*. CC. Thomas Publishing, Springfield. 1977; pp. 7-18.
- Pappagianis, D. Serology and Serodiagnosis of Coccidioidomycosis. In: *Coccidioidomycosis*. David A. Stearns, M.D., Editor, Plenum Publishing.
- Pappagianis, D. Immunoserologic Procedures in the Diagnosis and Management of Pulmonary Mycoses. In: *Handbook of Fungus Diseases*. H. Einstein, Editor. Amer. College of Chest Physicians. 1981.
- Pappagianis, D. Antibody in Cerebrospinal Fluid in Non-meningitic Coccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1972;10:173-179.
- Pappagianis, D., NJ. Lindsey, CE. Smith, and M. Saito. Antibodies in Human Coccidioidomycosis: Immunoelectrophoretic Properties. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1985;118:118-122.
- Pappagianis, D. False-positive Reactions of Cerebrospinal Fluid and Diluted Sera with the Coccidioid Latex-agglutination Test. *Am. J. Clin. Path.* 1976; 68:916-921.
- Smith, CE. Coccidioidomycosis. *Med. Clin. North Amer.* 1943; 27:790-807.
- Smith, CE., MT. Salito, RR. Beard, KM. Kepp, RW. Clark, and BV. Eddie. Serological tests in the diagnosis of coccidioidomycosis. *Am. J. Hyg.* 1950;52:1-2.
- Tosh, FE. Problems in the serological diagnosis of opportunistic fungus diseases. In: *Proceedings of the Second International Conference on Opportunistic Fungal Infections*. C. C. Thomas Publishing, Springfield, 1975; pp. 36-43.



SN10000

REV. 04/16

<p>Manufactured By</p>	<p>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</p>
	<p>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</p>

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

	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/EC.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünngungspuffer 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 / Solo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <=> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" essais / Contenido suficiente para "n" ensayos / Inhalt ausreichend für <=> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stoplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugé enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Numero de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data 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 / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant échantillon / 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 abilitato 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 dispositivos de los EU limitan la venta de dispositivos por o por la orden de licenciados en la práctica del cuidado de la salud. / Vorsicht: Der Verkauf oder die Verschreibung dieses Geräts durch einen zugelassenen Arzt unterliegt den Beschränkungen des US Bundesgesetzes.	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretta / 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.

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 símbolos, Zeichenerklärung)