

Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS®)

Latex Agglutination System for the detection of Cryptococcal Antigen in Serum and CSF

REF 140100, 140050

IVD

Rx Only

INTENDED USE

The Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS) is a qualitative and semiquantitative test system for the detection of capsular polysaccharide antigens of *Cryptococcus neoformans* in serum and cerebrospinal fluid (CSF).⁸

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

A simple, sensitive latex test capable of detecting the capsular polysaccharide of *C. neoformans* in CSF and serum was described and proven to be superior in sensitivity to the India Ink mount.^{2,3} Clinical studies established the prognostic value of the test^{4,6,8,9} and showed it to be a valuable aid in establishing a diagnosis when the culture was negative.⁵

Kaufman and Blumer⁹ reported that *C. neoformans* antigen was present in both the serum and spinal fluid in 86% of 330 confirmed cases of cryptococcal meningitis. Antigen was detected in CSF specimens in 99% of these 330 cases but in only 87% of serum samples. Paired serum and CSF specimens allowed detection of the antigen in each confirmed case. Parallel serologic studies for both antigen and antibody are recommended to ensure detection of extrameningeal cryptococcosis.

Newly emerging disease states and therapies have been shown to increase the opportunity for nonspecific interference in some serum specimens. Pretreatment of serum specimens with pronase prior to utilization of the CALAS kit reduces nonspecific interference and enhances the detection of capsular polysaccharide antigens of *Cryptococcus neoformans*.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

CALAS utilizes latex particles coated with anti-cryptococcal globulin (**Detection Latex**). The Detection Latex reacts with the cryptococcal polysaccharide antigen causing a visible agglutination. Latex particles coated with normal globulin (**Control Latex**) act as one of the control reagents. Nonspecific agglutination may occur due to the presence of certain macroglobulins (e.g. rheumatoid factors) in patient specimens. Treatment of serum specimens with pronase (Meridian Bioscience, Inc. Catalogue #140050) removes rheumatoid factor and other nonspecific interference.¹² These macroglobulins can be demonstrated in serum from patients with rheumatoid arthritis, sarcoidosis, cirrhosis, syphilis, scleroderma, psoriasis, gout, systemic lupus erythematosus and other conditions.^{4,11} Nonspecific interference is detected by the Control Latex reagent.

Agglutination of both the Control Latex and the Detection Latex requires two-fold serial titration of the specimen with both reagents. A four-fold higher titer with the Detection Latex than with the Control Latex is suggestive of cryptococcal disease but requires follow-up with specimens collected later in the course of the disease and culture results.¹⁰ Titers with less than four-fold differences are considered equivocal test results and further follow-up is recommended (see INTERPRETATION OF RESULTS).

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

- Sample Diluent** - Glycine buffered saline (pH 8.4 ± 0.1) containing bovine serum albumin and 0.01% Thimerosal as a preservative.
- Detection Latex** - Standardized latex particles coated with an optimal dilution of rabbit anticyptococcal globulin, in glycine buffered saline (pH 8.4 ± 0.1) containing less than 0.01% Thimerosal as a preservative.
- Control Latex** - Standardized latex particles coated with an optimal dilution of normal rabbit globulin, in glycine buffered saline (pH 8.4 ± 0.1) containing less than 0.01% Thimerosal as a preservative.
- Antibody Control** - Lyophilized goat anti-rabbit serum containing 0.01% Thimerosal as a preservative.
- Negative Control** - Lyophilized normal human serum containing 0.10% Sodium Azide as a preservative. Each donor unit used in the preparation of this reagent has been found to be nonreactive for Hepatitis B surface antigen, anti-Hepatitis C and HIV-1 / II antibodies by FDA approved test procedures.
- Positive Control** - Purified *Cryptococcus neoformans* polysaccharide antigen containing 0.01% Thimerosal as a preservative.
- Pronase** - Lyophilized containing 0.10% Sodium Azide as a preservative. Each vial contains enough enzyme to treat 10 serum specimens. Extra Pronase may be ordered (catalogue # 140050), that provides enough reagent to perform a minimum of 50 tests.
- Disposable Reaction Cards**
- Reaction Reference Photograph**
- Package Insert**

MATERIALS NOT PROVIDED

Purified water	Small serologic test tubes
1 x 0.01 mL pipettes	Rack
Rotator (optional)	Marking pen
Applicator sticks	25 µL, 100 µL, 200 µL (or equivalent) pipetter
Waterbath or heat block (56 C and 100 C)	

PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
- Controls must be run each day prior to running patient specimens.
- Reagents in each kit are matched and may give improper results if interchanged with a kit having a different lot number.
- Do not use reagents containing foreign matter, particulates or aggregates which indicate contamination or improper storage or handling.
- Specimens must not contain bacterial or other obvious signs of contamination.
- Heat inactivate the Negative Control each day the test is used.** Otherwise, reformation of certain globulins may occur and result in a false positive test.
- Never** heat inactivate the **Antibody Control** Reagent as this could cause aberrant control reactions.
- Sodium azide is a skin irritant. Avoid skin contact with the kit components. Do not mix with acid as this may result in the formation of hydrazoic acid, an extremely toxic gas.
- Do not store specimens in a frost free type freezer. Repeated freezing and thawing of the specimens can affect the test results.
- Care should be taken not to introduce syneresis fluid, which is present in various types of agar, into any specimens prior to testing as this may cause spurious results.

WARNING

Because no test method can offer complete assurance that human T-lymphotrophic virus type I / II lymphadenopathy associated virus (HIV-I / II), hepatitis B virus, hepatitis C virus, or other infectious agents are absent, these controls should be handled by the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories". Some reagents in this kit contain sodium azide. Disposal of reagents containing sodium azide into lead or copper plumbing can result in the formation of explosive metal azides. This can be avoided by flushing with a large volume of water during such disposal.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

 CALAS Pronase Reagent	Signal Word Danger Hazard Statements H302 - Harmful if swallowed H316 - Causes mild skin irritation H334 - May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled Contains Proteinase, streptomyces griseus Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P261 - Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapors/ spray P304 + P341 - IF INHALED: If breathing is difficult, remove to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing P308 + P313 - IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention P342 + P311 - If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER or doctor/ physician
--	--

 CALAS Negative Control	Signal Word Danger Hazard Statements H300 - Fatal if swallowed Precautionary Statements - EU (§28, 1272/2008) P301 + P310 - IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instructions with this material)
---	---

SHELF LIFE AND STORAGE

Store the CALAS kit at 2-8 C. Reagents are preserved with 0.01% thimerosal or 0.10% sodium azide; however, prolonged periods at room temperature should be avoided. Latex suspensions must not be frozen as this causes irreversible clumping.

Pronase, once reconstituted, can be stored at 2-8 C for approximately one month. Discard the solution if it becomes cloudy or contaminated. Once reconstituted it is suggested that the pronase solution be aliquotted and frozen if it will not be used within one month. Frozen aliquots of pronase can be stored at -20 C until the expiration date stated on the pronase vial label. Repeat freezing and thawing should be avoided. **Do not** store in a frost free type freezer. The expiration date of each CALAS kit is indicated on the kit label. Discontinue use of the kit if the included controls do not provide the proper reactions. If this occurs and reagents are still within their labeled expiration dating, please contact Meridian Technical Support at 1-800-343-3858.

REAGENT PREPARATION

Reconstitute the following reagents with the indicated volume of deionized water:

- a. **Antibody Control** 1.45 mL
- b. **Negative Control** 2.40 mL
- c. **Pronase** 2.50 mL

Reconstituted pronase should be aliquotted and frozen if it will not be used within one month.

Allow the reconstituted vials to stand at room temperature for 30 minutes before mixing them gently. Avoid foaming. Contents must be completely in solution prior to use. Heat inactivate the **Negative Control** each day the test is used.

Mix each kit vial by rocking gently prior to each use. Latex solutions must appear as homogeneous suspensions.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- A. **Cerebrospinal Fluid** (Meridian **does not** recommend that CSF specimens be routinely pretreated with pronase. However, recent evidence¹⁴ suggests that pronase treatment of CSF specimens may be useful with some specimens).
 - 1. Collect specimen aseptically following accepted procedures.
 - 2. Centrifuge at 1000 xg for 15 minutes to ensure the removal of all white cells and particulate matter.
 - 3. Carefully aspirate the spinal fluid into a sterile container and seal.
 - 4. Specimen may be processed immediately, refrigerated, preserved by freezing at -20 C or by adding thimerosal to provide a final concentration of 0.01%.
 - 5. **We recommend that CSF be inactivated by placing in a boiling water bath for 5 minutes prior to each test.**⁷ This tends to limit nonspecific interference.
 - 6. Allow to cool 3-4 minutes before testing.
- B. **Serum** (It is recommended that all serum specimens be treated with pronase as described below).
 - 1. Collect whole blood aseptically according to in-house procedures. The specimen must not contain anticoagulants as this will invalidate the test.
 - 2. Permit blood to clot for 10 minutes or more at room temperature in a collection tube.
 - 3. Centrifuge at 1000 xg for 15 minutes.
 - 4. Carefully aspirate the serum into a sterile container and seal.
 - 5. Specimen may be processed immediately, refrigerated, preserved by freezing at -20 C or by adding thimerosal to provide a final concentration of 0.01%.
 - 6. Add 200 µL of serum specimen to 200 µL of the pronase solution.
 - 7. Incubate serum/pronase solution at 56 C for 15 minutes.
 - 8. Immediately place the serum/pronase solution in a boiling water bath for a **full five minutes** to terminate enzymatic digestion.
 - 9. Allow solution to cool to room temperature.
 - 10. Specimen is ready for testing (see PROCEDURE).
- C. **Note:** For titrating purposes, patient specimen has been diluted 1:2 with the pronase solution.
Negative Control – Heat inactivate the **Negative Control** at 56 C for 30 minutes. It must be heat inactivated each day of use.

TEST PROCEDURE

- 1. Remove enough cards to run controls once for the day and each patient specimen.
NOTE: Controls do not need to be run on each card with each patient sample. See CALAS CONTROLS.
- 2. Consult the figure in the Procedure on the kit box label for a convenient system of setting up and labeling the controls and patient specimens on the Disposable Card(s).
- 3. Holding the **Positive Control** vial in a vertical position, squeeze one free-falling drop of reagent into each of the two designated rings.
- 4. Place 25 µL of the **Antibody Control** and **Negative Control** to the appropriate rings.
- 5. Place 25 µL of patient specimen in each of the two designated rings (see Figure).
- 6. Holding the **Detection Latex** in a vertical position, squeeze one free-falling drop of reagent into each of the designated rings.
- 7. In a similar fashion, add one drop of the **Control Latex** into each of the designated rings.
- 8. Using separate applicator sticks, mix the contents of the rings.
- 9. Rock the slide by hand or place it on a rotator and rotate at 125 ± 25 rpm for five minutes.
- 10. Read the results immediately and rate them on a scale ranging from negative to 4+. For comparison purposes, refer to the Reaction Card.
- 11. The gradations of the reaction strengths are as follows:
Negative (-) = a homogeneous suspension of particles with no visible clumping.
One plus (1+) = fine granulation against a milky background.
Two plus (2+) = small but definite clumps against a slightly cloudy background.
Three plus (3+) = large and small clumps against a clear background.
Four plus (4+) = large clumps against a very clear background.

Titration:

Patient specimens showing a 2+ or greater reaction with either the **Detection Latex** or **Control Latex** should be titrated with both reagents.

Prepare two-fold serial dilutions of the specimens as follows:

- 1. Place 0.25 mL of **Sample Diluent** in each of 5 test tubes labeled 1-5 and place in a rack.
- 2. Using a clean pipette, place 0.25 mL of patient specimen in tube # 1 and mix well.
- 3. Transfer 0.25 mL from tube # 1 to tube # 2 and mix well. Continue this dilution procedure through tube # 5. Transfer 0.25 mL from the fifth tube into a "holding" tube since further dilutions may be necessary.

	Tube	1	2	3	4	5
	Pronase treated specimens	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	Nonpronase treated specimens	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

- 4. Label the Disposable Card(s) to accommodate both the **Detection Latex** and **Control Latex** titration series of tests.
- 5. Beginning with tube # 4, transfer 25 µL of this dilution to each of two marked rings.
- 6. Repeat step 5 for Tubes # 3 through # 1. This procedure allows the use of a single pipette tip to place the four dilutions on the Disposable Card(s).
- 7. Add one drop of gently mixed **Detection Latex** to each labeled ring in the **Detection Latex** series.
- 8. Add one drop of gently mixed **Control Latex** to each labeled ring in the **Control Latex** series.
- 9. Using a separate segment of an applicator stick, mix the contents of each ring thoroughly spreading to the edge of the ring.
- 10. Rock the slide by hand or place it on a rotator and rotate at 125 ± 25 rpm for 5 minutes.
- 11. Read the results immediately and rate them on a scale ranging from negative to 4+. For comparison refer to the supplied Reaction Reference Photograph.

INTERPRETATION OF RESULTS

Control Reactions:

The pattern of control reagent agglutination reactions must be identical to that illustrated in the diagram on the inside lid of the kit box. Failure to obtain this pattern indicates that either one or more of the reagents is unsatisfactory or the tests were performed improperly and must be repeated. In either case, patient test results cannot be reported in the absence of satisfactory control readings.

The **Positive Control** should give a positive reaction with the **Detection Latex** and a negative reaction with the **Control Latex**. This tests the **Detection Latex** for its sensitivity to cryptococcal antigen. A positive reaction between the **Control Latex** and the **Positive Control** may indicate contamination of one or both of the control vials.

The **Antibody Control** detects the presence of rabbit globulin on the latex particles. Failure of the **Antibody Control** to give a positive reaction with the **Control Latex** indicates that one of the reagents is unsatisfactory.

The **Negative Control** should give negative reactions with both the **Detection Latex** and **Control Latex**. A positive reaction with either reagent may indicate possible contamination or freezing which could produce false positive results with patient specimens. A positive reaction may also occur by neglecting to heat inactivate the **Negative Control**.

Patient Specimens:

- A. **Negative:** If a negative or a 1+ reaction is observed in the initial screening test against the **Detection Latex**, the specimen is reported as negative. However, 1+ reactions may be suggestive of cryptococcus.⁹ If the status of a patient suggests a cryptococcal infection, subsequent specimens and culture are strongly recommended. If prozoning is suspected, repeat the Patient Test procedure with both a 1:10 and a 1:100 dilution of the specimen in the supplied **Sample Diluent** buffer.
- B. **Positive:** If a 2+ or greater reaction against **Detection Latex** is seen in the initial screening test, the specimen is titrated with the **Detection Latex** and **Control Latex** reagents. The titer is reported as the highest dilution showing a 2+ or greater reaction. While CSF titers of 1:4 or less are **presumptive** evidence of central nervous system infection by *C. neoformans*, additional follow-up and culture are strongly recommended. CSF titers of 1:8 or greater from patients with meningitis strongly suggest infection by *C. neoformans*. However, diagnosis should be confirmed by identification of the organism from culture or by microscopic examination of the specimen. The false positive rate associated with non-pronase treated serum with titers of less than 1:8 may be as high as 32%.⁹ Appropriate follow-up is strongly recommended.
- C. **Positive with Nonspecific Interference:** If the specimen titer with the **Detection Latex** is at least 4-fold higher than the non-specific interference (**Control Latex**) titer (e.g., **Detection Latex** titer 1:32, **Control Latex** titer 1:8 or lower), the test should be reported "Positive with nonspecific interference," and specimen titers against **Detection Latex** and **Control Latex** should be stated.^{1,11}
- D. **Invalid test due to nonspecific interference:** If the specimen titer against the **Detection Latex** is not at least 4-fold higher than that with the **Control Latex**, the test should be reported "Invalid due to nonspecific interference"^{1, 11} (see LIMITATIONS OF THE PROCEDURE).

The CALAS test appears to have both diagnostic and prognostic value since progressive disease is usually accompanied by increasing antigen titers. Declining titers are usually associated with clinical improvement (with or without therapy). Inadequate therapy is indicated by stationary or rising titers on subsequent sequential specimens.¹⁰ Cryptococcal antigen in body fluids of the untreated patient indicates active infection. However, in some treated patients, CALAS titers remain positive at low levels for extended periods during which the organism can no longer be demonstrated.

QUALITY CONTROL

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

PRONASE ACTIVITY CONTROL

Each serum/pronase solution processed acts as a control to determine if the CALAS Pronase has lost activity. If gelatinization or coagulation of the serum/pronase solution occurs, the CALAS Pronase has lost significant activity and should not be used. Note that cloudiness is likely to occur upon boiling and is not indicative of a compromised Pronase Reagent.

CALAS CONTROLS

Reliable results are obtained only if a satisfactory control run is made on the same day that patient specimens are tested.

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

EXPECTED VALUES

Cryptococcal antigen in the CSF or serum of untreated patients indicates active disease. Declining titers indicate a positive response to chemotherapy in the treated patient. Failure of titers to decline indicates inadequate therapy. Occasionally, however, low titers may persist for an indefinite period in the presence of nonviable fungus.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

One false positive reaction due to an antigen of *Trichosporon beigeli* which crossreacts with the *Cryptococcal neoformans* capsular polysaccharide has been reported.¹³ The reaction occurred in a serum specimen from a patient with disseminated *Trichosporon* infection.

Although the presence of nonspecific interference can invalidate the CALAS test results, this does not exclude the possibility of cryptococcal infection since cryptococcosis can occur concomitantly with other conditions (see BIOLOGICAL PRINCIPLES).

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The CALAS Pronase procedure has been shown to effectively reduce: 1) rheumatoid factor (RF) reactions, 2) prozone effects at high antigen concentrations, and 3) false negative results due to apparent masking of antigen following specific antibiotic therapies. Although these types of specimens are relatively rare in the overall population, selected populations may contain significant numbers.

A selected group of 85 problematic patient specimens (containing 16 RF sera and several sera of the "prozone" and "masked antigen" interference types described above) were assayed with both the CALAS kit (with pronase) and a reference EIA procedure. The EIA utilized an anticryptococcal monoclonal and was not affected by RF's or other nonspecific interference. The data in Table 1 show that only one result was discrepant when the EIA and CALAS procedures were compared directly.

Table 1 – Results of Comparison Between the CALAS kit (with Pronase) and Monoclonal Based EIA Procedure

		EIA		
		+	-	
CALAS	+	54	1*	100% sensitivity
	-	0	30	100% specificity

*The discrepant result was resolved as a low positive (1:8 titer) in favor of the CALAS Pronase procedure when the specimen was reassayed by the CDC latex kit. Thus, the sensitivity and specificity of the CALAS kit (with pronase) procedure were both 100% in this study.

Seventy-seven of these problematic specimens were also assayed by the CALAS kit without pronase treatment. CALAS results without pronase treatment included four false negative, two false positive, and five indeterminant results. The overall sensitivity and specificity of the CALAS kit without the pronase procedure were 91% and 92%, respectively.

When the CALAS kit (with pronase) procedure was compared directly with the original pronase procedure described by Stockman and Roberts¹² there was 100% agreement with 18 positive and 16 negative specimens tested. Titers were not significantly different (within a two-fold dilution) between these pronase procedures. Thus, the pronase procedures were demonstrated to be equivalent and reproducible.

Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS®)

Sistema di agglutinazione al lattice per la rilevazione dell'Antigene Criptococcico nel Siero e nel CSF

REF 140100, 140050

IVD

Rx Only

FINALITÀ D'USO

Il test Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS) è un test qualitativo e semi-quantitativo per la ricerca dell'antigene capsulare polisaccaridico di *Cryptococcus neoformans* nel siero e nel liquor cefalorachidiano (LCR).⁸

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

All'inizio degli anni '60 fu descritto un test di agglutinazione al lattice, semplice e sensibile, per la ricerca dell'antigene capsulare polisaccaridico di *Cryptococcus neoformans* nel siero e nel liquor cefalorachidiano (LCR): tale test si rivelò subito più sensibile rispetto all'esame con inchiostro di China.^{2,3} Gli studi clinici hanno stabilito il valore prognostico^{4, 6, 8, 9} e l'utilità diagnostica del test in caso di coltura negativa.⁵

Kaufman e Blumer⁹ hanno segnalato la presenza di antigene di *C. neoformans* sia nel siero che nel liquor in 284/330 casi confermati di meningite criptococcica (86%). In particolare, l'antigene era presente nel 99% dei campioni di liquor mentre la positività nel siero era pari all'87%. L'esame contemporaneo del liquor e del siero consentiva la rilevazione della presenza dell'antigene in tutti i casi confermati.

Alcune patologie emergenti, nonché alcuni protocolli terapeutici hanno causato un aumento della possibilità di trovare fattori di interferenza specifici nei campioni di siero. Il trattamento dei campioni di siero con Pronase prima di sottoporli ad esame con il test CALAS elimina i fattori di interferenza e favorisce la rilevazione della presenza dell'antigene capsulare polisaccaridico di *Cryptococcus neoformans*.

PRINCIPI BIOLOGICI

Il test CALAS utilizza particelle di lattice adsorbite con anticorpi anti-*Cryptococcus* (**Lattice di ricerca**): tali anticorpi reagiscono con l'antigene capsulare dando una reazione di agglutinazione apprezzabile ad occhio. Il kit contiene anche un secondo lattice, adsorbito con anticorpi non immuni (**Lattice di controllo**) che agisce come controllo della presenza di fattori di interferenza aspecifici. Reazioni di agglutinazione aspecifica sono determinate dalla presenza di alcune macroglobuline (ad es. Fattore reumatoide), la cui presenza è stata dimostrata in corso di varie patologie quali: artrite reumatoide, sarcoidosi, cirrosi epatica, sifilide, dermatite sclerosante, psoriasi, gotta, lupus eritematoso sistemico.^{1, 11} Il trattamento dei campioni di siero con Pronase (Meridian Bioscience, Inc. – Codice 140050) consente di eliminare tali fattori di interferenza aspecifici.¹²

Qualora si ottenga una reazione di agglutinazione con entrambi i lattici (**Lattice di ricerca e Lattice di controllo**), il campione deve essere titolato in doppio utilizzando entrambi i reagenti: se il titolo ottenuto con il **Lattice di ricerca** è quattro volte superiore a quello ottenuto con il **Lattice di controllo**, il risultato viene considerato indicativo di criptococcosi in atto, ma è necessario controllare il paziente con prelievi successivi e mediante esame culturale.¹⁰ Se la differenza tra i due titoli è inferiore a quattro volte, il risultato viene considerato dubbio e viene consigliato un follow-up del paziente (vedi paragrafo INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI).

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

1. **Diluente del campione** - Tampone glicina (pH 8,4 ± 0,1) contiene sieralbumina bovina ed thimerosal (0,01%) come conservante.
2. **Lattice di ricerca** - Sospensione di particelle di lattice adsorbite con anticorpi di coniglio anti-*Cryptococcus*, in tampone glicina (pH 8,4 ± 0,1) contiene thimerosal (≤ 0,01%) come conservante.
3. **Lattice di controllo** - Sospensione di particelle di lattice adsorbite con anticorpi normali di coniglio, in tampone glicina (pH 8,4 ± 0,1) contiene thimerosal (≤ 0,01%) come conservante.
4. **Controllo dell'Anticorpo** - Siero liofilizzato di montone anti-Immunoglobuline di coniglio, contiene thimerosal (0,01%) come conservante.
5. **Controllo negativo** - Siero umano normale liofilizzato contiene Sodio Azide (0,10%) come conservante. Ciascuna unità di siero utilizzata per la preparazione di questo reagente è risultata negativa ai test per la ricerca di HBsAg e di HIV-1 Ab mediante test approvati dall'FDA americana.
6. **Controllo positivo** - Soluzione contenente l'antigene polisaccaridico purificato di *Cryptococcus neoformans* e thimerosal (0,01%) come conservante.
7. **Pronase** - Miscela liofilizzata di enzimi eso- ed endo-poteolitici contiene Sodio Azide (0,10%) come conservante. Ciascun flacone, una volta ricostituito, contiene materiale sufficiente per trattare 10 campioni di siero. Confezioni aggiuntive di Pronase possono essere ordinate separatamente (N. catalogo # 140050). Tale prodotto contiene reagente sufficiente per un minimo di 50 tests.
8. **Lastrine di reazione usa e getta**
9. **Scheda con fotografia di riferimento per l'interpretazione dei risultati**
10. **Foglietto di istruzioni**

MATERIALI NON FORNITI

Acqua distillata o deionizzata	Provette per sierologia
Pipette da 0,01 mL	Porta provette
Agitatore (opzionale)	Pennarello marker
Bastoncini di legno	Pipettatrici da 25 µL, 100 µL e 200 µL
Bagnetto termostato o piastra riscaldante (56 C e 100 C)	

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. I controlli devono essere eseguiti ogni giorno, prima di iniziare ad analizzare i campioni.
3. I reagenti in ciascun kit sono standardizzati per il corrispondente numero di lotto. Utilizzare contemporaneamente reagenti appartenenti a lotti diversi può portare a risultati erronei.
4. Non utilizzare reagenti che mostrano evidenti segni di contaminazione (aggregati, corpi estranei in sospensione, ecc.) o di non corretta conservazione (congelamento, esposizione ad alte temperature).
5. I campioni non devono contenere batteri o mostrare segni di contaminazione.
6. **Occorre inattivare con il calore il Controllo Negativo una volta per ogni giorno di utilizzo del kit.** In caso contrario si può avere la formazione di alcune macroglobuline e si possono ottenere risultati falso positivi.
7. Non inattivare mai con il calore il **Controllo dell'Anticorpo**, perché ciò potrebbe falsare il risultato dei controlli stessi.
8. La sodio azide è un composto irritante per la pelle. Evitare il contatto con i reagenti. Non mescolare con acidi, poiché questa operazione può causare la formazione di acido idrazoico, un gas estremamente tossico.
9. Non conservare i campioni in congelatori dotati di sbrinamento automatico. Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento possono influenzare il risultato del test.
10. Occorre prestare attenzione affinché il liquido di sineresi che si forma da alcuni tipi di agar non venga a contatto con il campione prima di effettuare il test. Tale liquido potrebbe interferire con i risultati.

ATTENZIONE

Poiché nessun test può dare l'assoluta certezza che il Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV-1), il Virus dell'Epatite B o altri agenti infettivi siano assenti, i controlli devono essere maneggiati con le precauzioni consigliate nel Biosafety Level 2 per la manipolazione di campioni di siero o di sangue umano potenzialmente infetti: tali norme sono contenute nell'opuscolo "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratory" dal Center for Disease Control di Atlanta e dal National Institute of Health di Bethesda.

Alcuni reagenti contengono sodio azide. La loro eliminazione nelle tubazioni di rame o piombo può causare la formazione di azidi metalliche esplosive. Ciò può essere evitato lasciando scorrere notevoli quantitativi di acqua durante tale operazione.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

 CALAS Pronase Reagent	avvertenza Pericolo indicazioni di pericolo H302 - Nocivo se ingerito H316 - Provoca lieve irritazione cutanea H334 - Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato Contiene Proteinase, streptomyces griseus Consigli di Prudenza - UE (§28, 1272/2008) P261 - Evitare di respirare la polvere/ i fumi/ i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol. P304 + P341 - IN CASO DI INALAZIONE: se la respirazione è difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione P308 + P313 - IN CASO DI esposizione o di possibile esposizione, consultare un medico P342 + P311 - In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico
 CALAS Negative Control	avvertenza Pericolo indicazioni di pericolo H300 - Letale se ingerito Consigli di Prudenza - UE (§28, 1272/2008) P301 + P310 - IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico P321 - Trattamento specifico (vedi le istruzioni supplementari di primo soccorso su questa etichetta)

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Conservare il kit CALAS a 2-8 C. I reagenti contengono thimerosal (0,01%) oppure sodio azide (0,10%) come conservante: tuttavia si deve evitare la conservazione per prolungati periodi a temperatura ambiente. Le sospensioni di lattice non devono mai essere congelate, poiché ciò provoca la formazione irreversibile di aggregati.

La Pronase, una volta ricostituita, può essere conservata per circa un mese a 2-8 C. Eliminare la soluzione se diventa torbida o se mostra segni di contaminazione. Si consiglia di suddividere la Pronase in aliquote monodose e di congelarla se si pensa di non utilizzarla completamente entro un mese. Le aliquote congelate di pronase possono essere conservate a -20 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della fiala di pronase. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento. **NON** conservare i campioni in congelatori dotati di sbrinamento automatico. La data di scadenza del kit CALAS è riportata sull'etichetta della confezione. Non utilizzare il kit se i controlli in esso inclusi non danno le reazioni attese. Se ciò non avviene ed i reagenti non sono scaduti si consiglia di contattare il Servizio Clienti della Meridian Bioscience Europe.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Ricostituire i seguenti reagenti con il volume di acqua deionizzata indicato:

- a. Controllo dell'Anticorpo 1,45 mL
- b. Controllo negativo 2,40 mL
- c. Pronase 2,50 mL

Si consiglia di suddividere la Pronase in aliquote monodose e di congelarla se si pensa di non utilizzarla completamente entro un mese.

Una volta aggiunta l'acqua, lasciare i flaconi a temperatura ambiente per almeno 30 minuti prima di agitarli delicatamente. Evitare la formazione di schiuma. I reagenti devono essere completamente in soluzione prima di iniziare il test. Inattivare con il calore il **Controllo Negativo** ogni giorno che si usa il kit.

Mescolare bene il contenuto di ciascun flacone del kit prima dell'uso. I reagenti al lattice devono apparire come sospensioni omogenee.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- A. **Liquido cefalorachidiano** (Meridian non raccomanda il trattamento preliminare dei campioni di liquor con la Pronase, tuttavia un recente studio ¹⁴ ha dimostrato che il trattamento enzimatico del liquor può essere utile in alcuni casi).
1. Prelevare il campione di liquor mediante rachicentesi.
 2. Centrifugare a 1000 xg per 15 minuti per eliminare tutti i leucociti ed altri elementi figurati.
 3. Prelevare con attenzione il sovrantante, trasferirlo in una provetta sterile e sigillare l'imboccatura.
 4. I campioni possono essere esaminati immediatamente, conservati in frigorifero, congelati a -20 C oppure mediante aggiunta di timerosal ad una concentrazione finale pari allo 0,01%.
 5. **Si raccomanda di inattivare i campioni di liquor facendoli bollire (100 C) per 5 minuti prima di sottoporli al test.** ⁷ Questo trattamento termico tende a limitare le interferenze aspecifiche.
 6. Lasciar raffreddare il tutto per 3-4 minuti prima di iniziare il test.
- B. **Siero** (Si raccomanda il trattamento preliminare di tutti i campioni di siero mediante Pronase).
1. Prelevare sterilmente il sangue mediante tecniche standard. Non utilizzare alcun tipo di anticoagulante, poiché questi ultimi possono invalidare il risultato del test.
 2. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente per almeno 10 minuti.
 3. Centrifugare a 1000 xg per 15 minuti.
 4. Prelevare con attenzione il siero, trasferirlo in una provetta sterile e sigillare l'imboccatura.
 5. I campioni possono essere esaminati immediatamente, conservati in frigorifero, congelati a -20 C oppure mediante aggiunta di timerosal ad una concentrazione finale pari allo 0,01%.
 6. Aggiungere 200 µL di siero a 200 µL di Pronase.
 7. Incubare il tutto in bagnetto termostato a 56 C per 15 minuti.
 8. Collocare immediatamente la soluzione di siero/pronase in un bagno di acqua bollente per cinque minuti interi per terminare la digestione enzimatica.
 9. Lasciar raffreddare il tutto fino a raggiungere la temperatura ambiente.
 10. Il campione è pronto per essere analizzato (vedi paragrafo PROCEDURA DEL TEST).
- NOTA:** Qualora il campione risultasse positivo, durante l'allestimento delle diluizioni per la titolazione, si deve tenere presente che il siero è già stato diluito 1:2 con la Pronase.
- C. **Controllo Negativo** Inattivare termicamente il Controllo Negativo incubandolo a 56 C per 30 minuti. Il **Controllo Negativo** deve essere inattivato 1 volta al giorno, nei giorni in cui si utilizza il kit.

PROCEDURA DEL TEST

1. Utilizzare un numero di lastrine di reazione sufficiente per testare i controlli e i campioni dei pazienti. **NOTA: I controlli non devono essere testati su ogni lastrina di reazione e per ogni paziente.** Vedi CONTROLLI DEL KIT CALAS.
2. Consultare la Figura riportata sulla parte interna dell'etichetta della confezione per verificare la corretta disposizione ed identificazione dei controlli e dei campioni.
3. Tenendo il flaconcino del **Controllo positivo** in posizione verticale, distribuire una goccia di reagente nei due anelli di reazione corrispondenti.
4. Distribuire 25 µL di **Controllo dell'anticorpo** e di **Controllo negativo** negli anelli di reazione corrispondenti.
5. Distribuire 25 µL di campione biologico nei due anelli di reazione corrispondenti (vedi Figura).
6. Tenendo il flaconcino del **Lattice di ricerca** in posizione verticale, distribuire una goccia di reagente negli anelli di reazione corrispondenti.
7. Alla stesso modo, tenendo il flaconcino del **Lattice di controllo** in posizione verticale, distribuire una goccia di reagente negli anelli di reazione corrispondenti.
8. Utilizzando un bastoncino di legno diverso per ciascun anello, mescolare i reagenti.
9. Ruotare la lastrina manualmente o per mezzo di un agitatore orbitante (125 ± 25 rpm) per 5 minuti.
10. Leggere i risultati immediatamente e classificarli secondo una scala di intensità di agglutinazione crescente da negativo a 4+.
11. La scala di intensità di agglutinazione si basa sui seguenti parametri:
Negativa (-) = la sospensione ha un aspetto omogeneo; non si notano aggregati visibili.
Uno più (1+) = si nota una fine granulazione contro uno sfondo lattescante.
Due più (2+) = aggregati piccoli ma ben visibili contro uno sfondo leggermente torbido
Tre più (3+) = aggregati di varie dimensioni contro uno sfondo quasi limpido
Quattro più (4+) = aggregati di grandi dimensioni contro uno sfondo perfettamente limpido

Titolazione:

I campioni che mostrano una reazione di agglutinazione 2+ con il **Lattice di ricerca** o con il **Lattice di controllo** devono essere titolati utilizzando entrambi questi reagenti.

A tal fine si preparano diluizioni scalari in base 2 del campione seguendo queste istruzioni:

1. Distribuire 0,25 mL di **Diluente del campione** in 5 provette contrassegnate con numeri da 1 a 5.
2. Utilizzando una pipette pulita, distribuire 0,25 mL di campione nella provetta 1 e mescolare bene il tutto.
3. Trasferire 0,25 mL di soluzione dalla provetta 1 alla provetta 2 e mescolare bene. Continuare con questo metodo fino alla provetta 5. Trasferire 0,25 mL dalla provetta 5 ad una provetta vuota e conservarli in caso sia necessario allestire ulteriori diluizioni.

	Provetta	1	2	3	4	5
	Campioni trattati con Pronase	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	Campioni non trattati con Pronase	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

4. Etichettare la/le scheda/e monouso per ospitare le serie di test di titolazione sia del lattice per la rilevazione sia del lattice di controllo
5. Cominciando dalla provetta 4, distribuire 25 µL di campione nei due anelli di reazione corrispondenti.
6. Fare la stessa cosa per le provette da 3 ad 1: questo metodo consente di utilizzare un singolo puntale per le quattro diluizioni del campione.
7. Aggiungere una goccia di **Lattice di ricerca** a tutti gli anelli di reazione corrispondenti.
8. Aggiungere una goccia di **Lattice di controllo** a tutti gli anelli di reazione corrispondenti.
9. Utilizzando un pezzo di bastoncino di legno diverso per ciascun anello, mescolare i reagenti.
10. Ruotare la lastrina manualmente o per mezzo di un agitatore orbitante (125 ± 25 rpm) per 5 minuti.
11. Leggere i risultati immediatamente e classificarli secondo una scala di intensità di agglutinazione crescente da negativo a 4+.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Reazioni di controllo

I risultati ottenuti con la serie di controlli devono essere uguali a quelli riportati nella Figura. Se non si ottengono tali risultati significa che uno o più reagenti sono deteriorati oppure che il test è stato eseguito in modo non corretto e quindi deve essere ripetuto. In ogni caso, se ciò accade i risultati ottenuti con i campioni non devono essere refertati.

Il **Controllo positivo** deve dare una reazione positiva con il **Lattice di ricerca** e negativa con il **Lattice di controllo**. Questo controllo serve per verificare la sensibilità del **Lattice di ricerca** nei confronti dell'antigene criptococcico. Una reazione di agglutinazione tra il **Lattice di controllo** ed il **Controllo positivo** può indicare la contaminazione di uno dei due o di entrambi i reagenti.

Il **Controllo dell'anticorpo** rileva la presenza di immunoglobuline di coniglio sulle particelle di lattice: la mancanza di agglutinazione tra il **Controllo dell'anticorpo** ed il **Lattice di controllo** indica il deterioramento di uno dei due reagenti.

Il **Controllo negativo** deve dare una reazione negativa sia con il **Lattice di ricerca** sia con il **Lattice di controllo**. Una reazione positiva tra **Controllo negativo** ed il **Lattice di ricerca** od il **Lattice di controllo** indica una possibile contaminazione oppure un'eventuale avvenuto congelamento dei reagenti, che può causare reazioni false positive con i campioni dei pazienti. Una reazione positiva può anche essere causata dalla mancata inattivazione termica del **Controllo negativo**.

Campioni del paziente:

- A. **Negativo:** Se nel test di screening si osserva una reazione negativa o una debole agglutinazione (1+) con il **Lattice di ricerca** il campione viene considerato negativo. Tuttavia anche una debole agglutinazione (1+) può indicare la presenza di criptococco: ⁹ se la sintomatologia del paziente è riferibile a quella della infezione criptococcica si raccomanda di esaminare un secondo campione a distanza di alcuni giorni e di procedere all'esame colturale. Se si sospetta la presenza di un "effetto prozona", si consiglia di ripetere il test utilizzando una diluizione 1:10 ed 1:100 del campione nel diluente fornito.
- B. **Positivo:** Se nel test di screening si osserva una reazione di agglutinazione 2+ con il **Lattice di ricerca**, il campione viene considerato positivo e titolato utilizzando i due lattici. Il titolo è rappresentato dalla più alta diluizione del campione che provoca una reazione di agglutinazione 2+. Anche se titoli 1:4 nel liquor consentono una diagnosi **presuntiva** di infezione del Sistema Nervoso Centrale sostenuta da *C. neoformans*, si consiglia comunque di controllare il paziente con prelievi successivi e di procedere all'esame colturale. Titoli antigenici 1:8 nel liquor sono fortemente indicativi di meningite criptococcica. La diagnosi dovrebbe tuttavia essere confermata dall'isolamento colturale di *C. neoformans* o dalla sua osservazione all'esame microscopico del campione. La percentuale di risultati falsi positivi associata al mancato trattamento con Pronasi di campioni di siero con titolo < 1:8 può essere pari al 32%.⁹ In questo caso il follow-up dei pazienti è fortemente raccomandato.
- C. **Positivo con interferenze aspecifiche:** Se il titolo ottenuto con il **Lattice di ricerca** è almeno 4 volte maggiore di quello dovuto alle interferenze aspecifiche (**Lattice di controllo**) (ad es. Titolo con **Lattice di ricerca** 1:32, titolo con **Lattice di controllo** 1:8 o più basso), il risultato viene refertato come "positivo con interferenze aspecifiche", con l'indicazione di entrambi i titoli.¹¹
- D. **Risultato non valido a causa di interferenze aspecifiche:** Se il titolo ottenuto con il **Lattice di ricerca** non è almeno 4 volte maggiore di quello dovuto alle interferenze aspecifiche (**Lattice di controllo**), il risultato viene refertato come "non valido a causa di interferenze aspecifiche"^{9,11} (vedi paragrafo LIMITI DELLA PROCEDURA).

Il risultato del test CALAS ha valore sia diagnostico che prognostico, poiché la progressione della malattia è di solito accompagnata dall'aumento del titolo antigenico. Per contro, la diminuzione del titolo è collegata al miglioramento del quadro clinico (con o senza intervento terapeutico). L'inefficiacia della terapia è indicata dall'andamento stazionario o dall'aumento del titolo nei campioni successivi.¹⁰ La presenza di antigene criptococcico nei fluidi biologici di pazienti non trattati è indicativo di infezione acuta. Tuttavia, in alcuni pazienti sottoposti a trattamento antimicotico, il titolo antigenico rilevato mediante il test CALAS può mantenersi a bassi livelli per periodi di tempo molto prolungati, durante i quali non è più possibile dimostrare altrimenti la presenza di *C. neoformans*.

CONTROLLO QUALITÀ

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

DELL'EFFICACIA DELLA PRONASE

Ogni soluzione siero/Pronase funziona come controllo per verificare l'efficacia della Pronase: se si verifica la coagulazione o la gelatinizzazione della soluzione siero/Pronase, ciò indica la perdita di efficacia da parte dell'enzima, che pertanto non deve essere usato. Invece, la torbidità che spesso compare durante la bollitura è normale e non indica in alcun modo una perdita di efficacia da parte della Pronase.

CONTROLLI DEL KIT CALAS

I controlli previsti dalla Metodica devono essere eseguiti ogni giorno che si esegue il test per essere certi dell'affidabilità del kit e della qualità dei risultati.

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

VALORI ATTESI

La presenza di antigene criptococcico nei fluidi biologici di pazienti non trattati è indicativo di infezione acuta. La diminuzione del titolo è indicativa di una positiva risposta alla terapia antimicotica nei pazienti trattati. L'inefficacia della terapia è indicata dalla mancata diminuzione o dall'aumento del titolo in campioni successivi. Tuttavia, in alcuni pazienti, il titolo antigenico può mantenersi a bassi livelli per periodi di tempo molto prolungati, durante i quali non è più possibile dimostrare altrimenti la presenza di *C. neoformans*.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Un risultato negativo con il test CALAS non esclude la diagnosi di criptococcosi, soprattutto se è stato esaminato un solo campione ed il paziente presenta una sintomatologia riferibile a quella dell'infezione sostenuta da *C. neoformans*.

E' stata dimostrata una reazione crociata con l'antigene di *Trichosporon beigeli*:¹³ tale risultato è stato osservato esaminando un campione di siero di un paziente con infezione disseminata causata da *Trichosporon*.

Sebbene la presenza di interferenze aspecifiche possa invalidare il risultato ottenuto con il test CALAS, ciò non esclude la possibile presenza di criptococcosi, poichè essa può essere osservata anche in presenza di altre condizioni patologiche (vedi paragrafo PRINCIPI BIOLOGICI).

PRESTAZIONI SPECIFICHE

E' stato dimostrato che il trattamento enzimatico dei campioni con CALAS Pronasi riduce efficacemente: 1) le reazioni aspecifiche dovute alla presenza di fattore reumatoide (RF), 2) l'effetto prozona in presenza di alte concentrazioni di antigene, 3) le reazioni falsi negativi dovute ad apparente mascheramento dell'antigene nei campioni a basso titolo in corso di terapia. Sebbene la presenza di questo tipo di campioni sia relativamente rara nella popolazione in generale, in particolari categorie di pazienti la percentuale di incidenza può raggiungere livelli significativi.

Un gruppo selezionato di 85 campioni provenienti da pazienti "problematici" (16 campioni contenevano fattore reumatoide, mentre parecchi presentavano i fenomeni di prozona o di mascheramento dell'antigene precedentemente citati) è stato testato con il CALAS (utilizzando la Pronase) e con una metodica EIA di riferimento. Il test EIA utilizza un anticorpo monoclonale e non risente della presenza di fattore reumatoide o di altre interferenze aspecifiche. I dati riassunti nella Tabella 1 mostrano che solo un campione dava risultati discrepanti tra i due test.

Tabella 1 – Risultati dello studio comparativo tra il kit CALAS (con Pronase) ed un test EIA basato su anticorpi monoclonali

		EIA		
		+	-	
CALAS	+	54	1*	sensibilità = 100%
	-	0	30	specificità = 100%

*Il risultato discrepante è stato risolto come positivo a basso titolo (1:8) in favore del CALAS rianalizzando il campione con i reagenti di agglutinazione al lattice messi a disposizione dal CDC di Atlanta. Pertanto i dati di sensibilità e di specificità del kit CALAS (con pronase) ottenuti durante questo studio erano entrambi pari al 100%.

Settantasette di questi sieri di pazienti "problematici" sono stati testati con il test CALAS anche senza il trattamento con Pronase. I risultati ottenuti comprendevano quattro campioni falsi negativi, due falsi positivi e cinque indeterminati. I dati di sensibilità e di specificità del CALAS senza Pronase sono rispettivamente pari al 91% ed al 92%.

Quando i risultati ottenuti con il kit CALAS (con Pronase) sono stati confrontati direttamente con quelli ottenuti con il metodo originale di trattamento con Pronase descritto da Stockman e Roberts,¹² la concordanza tra i due metodi era pari al 100%, con 18 campioni positivi e 16 campioni negativi. I titoli non mostravano differenze significative (comprese entro una diluizione). Pertanto fu possibile dimostrare che i due protocolli di trattamento con Pronase erano equivalenti e riproducibili.

Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS®)

Test d'agglutination latex pour la détection de l'antigène cryptococcique dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (LCR)

REF 140100, 140050

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le test d'agglutination latex de l'antigène de *Cryptococcus neoformans* (CALAS) est une méthode qualitative et semi-quantitative de détection des antigènes polysaccharidiques capsulaires de *Cryptococcus neoformans* dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (LCR).⁵

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Un test latex simple, sensible capable de détecter le polysaccharide capsulaire de *C. neoformans* dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sérum a été décrit et a montré une sensibilité supérieure à la coloration à l'encre de Chine.^{2,3} Des études cliniques ont montré la valeur pronostique du test^{4,6,9} ainsi que sa valeur pour établir le diagnostic quand la culture est négative.⁵

Kaufman et Blumer⁹ ont montré que l'antigène de *C. neoformans* était présent à la fois dans le sérum et dans le LCR chez 86% de 330 cas confirmés de méningite à cryptocoques. L'antigène a été détecté dans 99% des échantillons de LCR de ces 330 cas mais seulement dans 87% des échantillons de sérum. Les échantillons regroupés de sérum et de LCR ont permis la détection de l'antigène dans tous les cas. Il est recommandé de faire en parallèle des recherches sérologiques de l'antigène et de l'anticorps pour assurer la détection des cryptococcoses extraméningées.

Des traitements et des stades de la maladie récemment apparus ont montré qu'ils augmentaient la fréquence des interférences non spécifiques dans quelques échantillons de sérum. Un prétraitement des échantillons de sérum à la pronase avant utilisation du kit CALAS permet de réduire l'interférence non spécifique et augmente la détection des antigènes polysaccharidiques capsulaires de *Cryptococcus neoformans*.

PRINCIPE DU TEST

CALAS utilise des particules de latex recouvertes d'anticorps polyclonaux de lapin anti-*Cryptococcus neoformans* (Réactif latex). Les anticorps anti-*Cryptococcus neoformans* réagissent avec l'antigène polysaccharidique capsulaire présent dans le sérum ou le LCR et provoquent une agglutination visible à l'œil nu. Des particules de latex recouvertes d'anticorps de lapins non immunisés servent de réactif de contrôle. Des agglutinations non spécifiques peuvent se produire en présence de certaines macroglobulines (comme par ex. les facteurs rhumatoïdes) dans les échantillons de patients. Ces macroglobulines peuvent être présentes dans les sérums de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde, de sarcoïdose, de cirrhose, de syphilis, de sclérodémie, de psoriasis, de goutte, de lupus érythémateux disséminé et dans d'autres cas.^{1,11} Le traitement des échantillons de sérum à la pronase (Meridian Bioscience, Inc. référence du catalogue #140050) élimine le facteur rhumatoïde et les autres interférences non spécifiques.¹²

L'agglutination des anticorps de lapins non immunisés et des anticorps de lapins anti-*Cryptococcus neoformans* nécessite un dosage en série double de l'échantillon avec chacun des réactifs. Un titre quatre fois plus élevé avec les anticorps anti-*Cryptococcus neoformans* qu'avec les anticorps normaux suggère une cryptococcose mais nécessite un suivi avec une nouvelle collecte d'échantillons et des résultats de cultures.¹⁰ Des titres avec une différence de moins de quatre fois sont considérés comme douteux et un suivi est recommandé (cf. INTERPRETATION DES RESULTATS).

MATERIEL FOURNI

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

1. Diluant échantillon - Tampon glycine (pH 8,4 ± 0,1) contenant de l'albumine bovine et contenant du thimérosal (0,01%) comme conservateur.
2. Réactif détection latex - Particules de latex standardisées recouvertes d'une dilution optimisée d'anticorps polyclonaux de lapins anti-*Cryptococcus neoformans* (antigène polysaccharidique capsulaire) dans du tampon glycine (pH 8,4 ± 0,1) contenant moins de 0,01% de thimérosal comme conservateur.
3. Réactif contrôle latex - Particules de latex standardisées recouvertes d'une dilution optimisée d'anticorps normaux de lapins non immunisés dans du tampon glycine (pH 8,4 ± 0,1) contenant moins de 0,01% de thimérosal comme conservateur.
4. Contrôle anticorps - Sérum lyophilisé (anticorps de chèvre anti-anticorps normaux de lapins) contenant du thimérosal (0,01%) comme conservateur.
5. Contrôle négatif - Sérum humain normal lyophilisé contenant de l'azide de sodium (0,10%) comme conservateur. Chaque sérum utilisé pour la préparation de ce réactif a été trouvé négatif pour l'antigène de surface de l'hépatite B et pour les anticorps VIH-I/II par des méthodes de dosage reconnues par la FDA.
6. Contrôle positif - Antigène polysaccharidique purifié de *Cryptococcus neoformans* contenant du thimérosal (0,01%) comme conservateur.
7. Pronase - Enzyme lyophilisée contenant 0,10% azide de sodium comme conservateur. Chaque flacon contient suffisamment d'enzyme pour traiter 10 échantillons de sérum. Si nécessaire, de la pronase supplémentaire peut être commandée. Ce réactif supplémentaire (Référence du catalogue #140050) est conditionné pour permettre 50 tests au minimum.
8. Cartes de réaction jetables
9. Photo de référence des réactions
10. Notice

MATERIEL NON FOURNI

Eau distillée	Petits tubes de tests sérologiques
Pipettes de 0,01 mL	Portoir
Agitateur (facultatif)	Feutre marqueur
Bâtonnets d'application	Pipettes de 25 µL, 100 µL et 200 µL (ou équivalent)
Bain-marie ou enceinte thermostatée (56 et 100 C)	

PRECAUTIONS

1. Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
2. Les contrôles doivent être effectués chaque jour avant de doser les échantillons des patients.
3. Les réactifs de chaque coffret constituent un tout et peuvent donner des résultats erronés s'ils sont mélangés avec un coffret ayant un numéro de lot différent.
4. Ne pas utiliser de réactifs contenant des corps étrangers, des particules ou des agrégats qui indiquent une contamination, un stockage ou une manipulation incorrecte.
5. Les échantillons ne doivent pas contenir de bactéries ou d'autres signes évidents de contamination.
6. Inactiver le Contrôle Négatif par la chaleur le jour de l'utilisation du test. Autrement, des modifications de certaines globulines pourraient avoir lieu et provoquer des faux positifs.
7. Ne jamais inactiver par la chaleur l'anti-globuline de contrôle car cela pourrait donner des réactions de contrôle aberrantes.
8. L'azide de sodium est un irritant cutané. Éviter le contact des composants du coffret avec la peau. Ne pas mélanger avec des acides car cela pourrait provoquer la formation d'acide hydrazoïque, gaz extrêmement toxique.
9. Ne pas stocker les échantillons dans un congélateur à froid ventilé (sans givre). La congélation et la décongélation répétée des échantillons peut affecter les résultats du test.
10. Ne pas introduire dans les échantillons de fluide de synérèse, présent dans de nombreux types de gélose. Ce fluide pourrait causer de faux résultats.

ATTENTION

Parce qu'aucun dosage est capable de démontrer l'absence d'une infection à VIH type I/II, l'hépatite B, l'hépatite C, ou autres agents infectieux, ces contrôles doivent dès lors être manipulés avec un niveau 2 de sécurité comme il est recommandé pour tout sérum ou échantillon de sang humain potentiellement dangereux dans le manuel CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories". Certains réactifs contenus dans ce coffret contiennent de l'azide de sodium. L'élimination de ces réactifs dans les canalisations de cuivre ou de plomb peut provoquer la formation d'azides métalliques explosifs. Ceci peut être évité en rinçant les canalisations à grandes eaux lors de telles éliminations.

DANGER ET MISES EN GARDE

 CALAS Pronase Reagent	mention d'avertissement Danger mentions de danger H302 - Nocif en cas d'ingestion H316 - Provoque une légère irritation cutanée H334 - Peut provoquer des symptômes allergiques ou d'asthme ou des difficultés respiratoires par inhalation Contient Proteinase, streptomyces griseus Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008) P261 - Éviter de respirer les poussières/ fumées/ gaz/ brouillards/ vapeurs/ aérosols. P304 + P341 - EN CAS D'INHALATION: s'il y a difficulté à respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer P308 + P313 - EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin P342 + P311 - En cas de symptômes respiratoires: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin
 CALAS Negative Control	mention d'avertissement Danger mentions de danger H300 - Mortel en cas d'ingestion Conseils de prudence - UE (par 28, 1272/2008) P301 + P310 - EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin P321 - Traitement spécifique (voir les instructions supplémentaires pour les premiers secours sur cette étiquette)

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

Stockier le coffret CALAS à 2-8 C. les réactifs contiennent 0,01% de thimérosal ou 0,10% d'azide de sodium comme conservateur. Cependant des périodes prolongées à température ambiante doivent être évitées. Les suspensions latex ne doivent pas être congelées car cela provoque une précipitation irréversible.

La pronase, une fois reconstituée peut se conserver environ un mois à 2-8 C. Jeter la solution si elle devient trouble ou contaminée. Il est conseillé d'aliqoter et de congeler la solution de pronase reconstituée si elle doit être utilisée pendant plus d'un mois. Les aliqotes de pronase congelées peuvent être conservées à -20 C jusqu'à la date de péremption qui figure sur l'étiquette du flacon de pronase. Les congélations/ décongélations répétées doivent être évitées. Ne pas stocker dans un congélateur à froid ventilé (sans givre). La date de péremption de chaque coffret CALAS est indiquée sur l'étiquette. Arrêter d'utiliser un coffret si les contrôles ne donnent plus les réactions normales. Si cela arrive et si les réactifs n'ont pas dépassé leur date de péremption, contacter le service technique de Meridian Bioscience.

PREPARATION DES REACTIFS

Reconstituer les réactifs suivants avec le volume indiqué d'eau désionisée.

- a. Contrôle anticorps 1,45 mL
- b. Contrôle négatif 2,40 mL
- c. Pronase 2,50 mL

La pronase reconstituée devra être aliquotée et congelée si elle doit être utilisée pendant plus d'un mois.

Laisser les tubes de réactifs reconstitués à température ambiante pendant 30 minutes avant de les agiter légèrement. Eviter de faire mousser. Le contenu doit être parfaitement solubilisé avant utilisation. Inactiver par la chaleur le contrôle négatif le jour de l'utilisation du test.

Homogénéiser chaque tube du coffret par inversion avant chaque utilisation. Les solutions de latex doivent avoir un aspect de suspension homogène.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

- A. Liquide céphalo-rachidien (LCR) (Nous ne recommandons pas de prétraiter en routine les échantillons de LCR à la pronase. Cependant des données récentes¹⁴ suggèrent que le traitement à la pronase d'échantillons de LCR peut être utile pour certains échantillons).
 1. Prélever aseptiquement les échantillons en suivant les procédures appropriées.
 2. Centrifuger à 1000 xg pendant 15 minutes pour assurer l'élimination des globules blancs et d'autres structures diverses.
 3. Aspirer avec précaution le LCR dans un conditionnement stérile et sceller.
 4. L'échantillon peut être traité immédiatement, réfrigéré, conservé par congélation à -20 C ou en ajoutant du thimérosal pour arriver à une concentration finale de 0,01%.
 5. Nous recommandons d'inactiver le LCR en le plaçant dans un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes, avant chaque test.⁷ Ceci permet de limiter les interférences non spécifiques.
 6. Laisser refroidir 3-4 minutes avant de tester.
- B. Sérum (Il est recommandé de prétraiter tous les échantillons de sérum à la pronase comme décrit ci-dessous):
 1. Prélever aseptiquement le sang total en suivant les procédures appropriées. L'échantillon ne doit pas contenir d'anticoagulants qui invalide le test.
 2. Laisser coaguler le sang pendant 10 minutes ou plus à température ambiante dans un tube de prélèvement.
 3. Centrifuger à 1000 xg pendant 15 minutes.
 4. Aspirer avec précaution le sérum dans un conditionnement stérile et sceller.
 5. L'échantillon peut être traité immédiatement, réfrigéré, conservé par congélation à -20 C ou en ajoutant du thimérosal pour arriver à une concentration finale de 0,01%.
 6. Mélanger 200 µL de sérum à 200 µL de solution de pronase .
 7. Incuber la solution sérum/pronase à 56 C pendant 15 minutes.
 8. Placez immédiatement la solution de sérum/pronase dans un bain-marie d'eau bouillante pendant cinq minutes complètes pour terminer la digestion enzymatique.
 9. Laisser refroidir la solution sérum/pronase jusqu'à température ambiante.
 10. L'échantillon est prêt à être testé (cf. PROCEDURE DE TEST).
- C. REMARQUE: La dilution de l'échantillon de sérum est donc de 1:2. Contrôle négatif - Avant chaque utilisation, inactiver par la chaleur le contrôle négatif à 56 C pendant 30 minutes.

PROCEDURE DE TEST

1. Prélever le nombre de cartes jetables nécessaires pour tester les contrôles (un fois par jour) et les échantillons de patients. Remarque: Il n'est pas nécessaire de tester les contrôles sur chaque carte, en même temps que chaque échantillon. Voir CONTROLES DE CALAS.
2. Se reporter au schéma de procédure de l'étiquette de la boîte pour répartir et étiqueter les contrôles et les échantillons de manière adéquate.
3. En tenant le flacon de Contrôle Positif verticalement, faire tomber une goutte de réactif sur chacun des deux cercles marqués.
4. Mettre une goutte (25 µL) de Contrôle Anticorps et de Contrôle Négatif sur les cercles appropriés.
5. Mettre une goutte (25 µL) d'échantillon du patient sur chacun des deux cercles marqués.
6. En tenant le flacon de Détection Latex verticalement, faire tomber une goutte (25 µL) de réactif sur chacun des cercles marqués.
7. De manière analogue, ajouter une goutte (25 µL) de Contrôle Latex sur chacun des cercles marqués.
8. En utilisant des bâtonnets d'application différents, mélanger le contenu des cercles.
9. Agiter la plaque manuellement ou placer la plaque sur un agitateur à 125 ± 25 rpm pendant cinq minutes.
10. Lire les résultats immédiatement et les évaluer à l'aide de l'échelle graduée de négatif à 4+ . Se reporter à la photographie de référence des réactions pour effectuer des comparaisons.
11. Les degrés d'intensité de la réaction sont les suivants:
Négatif (-) = suspension fine de particules sans agrégats visibles
un plus (1+) = fines granulations sur un fond laiteux
deux plus (2+) = agrégats petits mais définis sur un fond légèrement trouble
trois plus (3+) = petits et grands agrégats sur un fond clair
quatre plus (4+) = grands agrégats sur un fond très clair

Titration:

Les échantillons de patients ayant un degré 2+ ou supérieur soit avec le réactif Détection Latex soit avec le réactif Contrôle Latex devront être titrés avec les deux réactifs.

Préparer des dilutions sérielles en double des échantillons comme suit:

1. Transférer 0,25 mL de diluant échantillons dans chaque tube d'une série de cinq tubes marqués 1 à 5. Les tubes sont ensuite placés sur un portoir.
2. A l'aide d'une pipette propre, ajouter 0,25 mL d'échantillon patient dans le tube marqué "1" et homogénéiser.
3. Transférer 0,25 mL du mélange du tube 1 dans le tube 2 et homogénéiser. Poursuivre la procédure de dilution jusqu'au tube marqué "5". Transférer 0,25 mL du 5^{ème} tube dans un tube vide au cas où des dilutions subséquentes sont nécessaires.

	Tube marqué	1	2	3	4	5
Echantillons traités à la pronase	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
Echantillons non traités à la pronase	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	

4. Étiquetez la ou les carte(s) jetable(s) pour identifier les séries de tests de titrage du latex de détection et du latex de contrôle.
5. En commençant par le tube marqué "4", transférer 25 µL de la dilution sur chacun des cercles marqués.
6. Répéter l'étape 5 pour les tubes marqués "3" à "1". Cette procédure permet de n'utiliser qu'un seul cône pour déposer les quatre dilutions sur les cartes de test.
7. Ajouter une goutte de réactif Détection latex dans chaque cercle de la série Détection Latex.
8. Ajouter une goutte de réactif Contrôle latex dans chaque cercle de la série Contrôle Latex.
9. En utilisant une extrémité propre du bâtonnet d'application, mélanger doucement le contenu de chaque cercle.
10. Agiter la carte manuellement, ou la placer sur un agitateur à 125 ± 25 rpm pendant cinq minutes.
11. Lire les résultats immédiatement et les évaluer à l'aide de l'échelle graduée de négatif à 4+ . Se reporter à la photographie de référence des réactions pour effectuer des comparaisons.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats des contrôles

L'aspect des réactions d'agglutination des réactifs de contrôle doit être identique à celui représenté sur la figure. Si on n'obtient pas cet aspect, alors, soit un ou plusieurs des réactifs est défectueux, soit les tests n'ont pas été effectués convenablement et doivent être répétés. Dans ces deux cas, les résultats obtenus pour les patients ne peuvent pas être rendus en l'absence de lectures des contrôles correctes.

Le Contrôle Positif doit donner une réaction positive avec le réactif Détection Latex et une réaction négative avec le réactif Contrôle Latex. Une réaction positive entre le réactif Contrôle Latex et le Contrôle Positif peut être le signe de la contamination de l'un ou l'autre des flacons.

Le Contrôle Anticorps détecte la présence d'anticorps de lapin sur les particules de latex. L'incapacité du Contrôle Anticorps à donner une réaction positive avec le réactif Contrôle Latex indique que l'un des deux réactifs est défectueux.

Le Contrôle Négatif doit donner des réactions négatives à la fois avec le réactif Contrôle Latex et le réactif Détection Latex. Une réaction positive avec l'un des deux réactifs peut être le signe d'une contamination possible ou être dû à la congélation qui peut produire des faux positifs avec les échantillons de patients. Une réaction positive peut aussi avoir lieu si on néglige d'inactiver par la chaleur le Contrôle Négatif.

Echantillons de patients

- A. Négatif: Si on observe une réaction négative ou 1+ lors du test initial de screening avec le réactif Détection Latex, l'échantillon est considéré comme négatif. Cependant, des réactions 1+ peuvent suggérer des cryptococcoses.⁹ Si l'état du patient suggère une infection à *Cryptococcus*, il est fortement recommandé d'effectuer des prélèvements et des mises en culture ultérieures. Si on suspecte un phénomène de prozone, répéter la procédure de test de l'échantillon du patient avec des dilutions de l'échantillon au 1:10 et au 1:100 avec le Diluant échantillon fourni.
- B. Positif: Si on observe une réaction 2+ ou plus élevée lors du test initial de dépistage avec le réactif Détection Latex, l'échantillon sera titré avec le réactif Détection Latex et le réactif Contrôle Latex. Le titre est rendu comme étant la dilution la plus élevée donnant une réaction 2+ ou supérieure. Bien que des titres en LCR de 1:4 ou moins soient une présomption d'infection du système nerveux central par *C. neoformans*, un suivi complémentaire et des mises en culture sont fortement recommandés. Des titres en LCR de 1:8 ou plus chez des patients à méningite suggèrent fortement une infection par *C. neoformans*. Cependant, le diagnostic devra être confirmé par l'identification de l'organisme en culture ou par observation microscopique de l'échantillon. Le taux de faux positifs avec des sérums non prétraités ayant des titres de moins de 1:8 peut atteindre jusqu'à 32%.⁹ Un suivi approprié est fortement recommandé.
- C. Positif avec interférences non spécifiques: Si le titre de l'échantillon avec le réactif Détection Latex est au moins quatre fois plus élevé que le titre avec le réactif Contrôle Latex (par ex.: titre avec le réactif Détection Latex 1:32, et titre avec le réactif Contrôle Latex 1:8 ou inférieur) le test doit être rendu « positif avec interférences non spécifiques » et les titres de l'échantillon avec le réactif Détection Latex et avec le réactif Contrôle Latex devront être indiqués.^{3,11}
- D. Test non valable pour cause d'interférences non spécifiques: Si le titre de l'échantillon avec le réactif Détection Latex n'est pas au moins quatre fois plus élevé que le titre avec le réactif Contrôle Latex, le test doit être rendu « non valable par interférences non spécifiques »^{1,11} (cf. LIMITES DU TEST).

Le test CALAS a une valeur diagnostique et pronostique car la maladie évolutive est habituellement accompagnée d'une augmentation des titres des antigènes. Une diminution des titres est habituellement associée à des améliorations cliniques (avec ou sans traitement). Un traitement inadapté se traduit par des titres stationnaires ou en augmentation sur des échantillons consécutifs.¹⁰ La présence d'antigène cryptococcique dans les fluides de l'organisme est le signe d'une infection en cours. Cependant, chez certains patients traités, les titres restent faiblement positifs pendant une période prolongée pendant laquelle l'organisme ne peut plus être mis en évidence.

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.

VERIFICATION DE L'ACTIVITE DE LA PRONASE

Chaque sérum traité par la solution de pronase sert de contrôle pour déterminer si la pronase a perdu de son activité. Si il se produit une gélatinisation ou une coagulation de la solution sérum pronase, la pronase a subi une perte significative de son activité et ne devra pas être utilisée. Toutefois si un trouble apparaît vraisemblablement pendant l'ébullition, ce n'est pas un signe de la dégradation du réactif pronase.

CONTROLES DE CALAS

On obtiendra des résultats fiables seulement si les contrôles sont testés le jour du dosage des échantillons de patients.

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

La présence d'antigène cryptococcique dans le LCR ou le sérum de patients non traités est le signe d'une infection en cours. Une diminution des titres chez un patient traité montre une réponse positive au traitement. Une absence de diminution des titres correspond à un traitement inadapté. Cependant, des titres bas peuvent quelquefois persister en présence de levures non viables.

LIMITES DU TEST

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

Un cas de faux positif dû à l'antigène de *Trichosporon beigeli* ayant des réactions croisées avec le polysaccharide capsulaire de *Cryptococcus neoformans* a été signalé.¹³ Il a été trouvé chez un patient atteint d'une infection généralisée à *Trichosporon*.

Bien que la présence d'interférences non spécifiques invalide les résultats du test, cela n'exclut pas la possibilité d'une infection à *Cryptococcus* puisque la cryptococcose peut être associée à d'autres pathologies (cf. PRINCIPE DU TEST).

PERFORMANCES DU TEST

Le prétraitement à la CALAS Pronase a montré qu'il diminuait efficacement: 1) Les réactions avec le facteur rhumatoïde, 2) Les phénomènes de prozone avec des concentrations élevées en antigène, 3) Les faux négatifs dus à un masquage apparent de l'antigène à la suite d'antibiothérapies spécifiques. Bien que ces types d'échantillons soient relativement rares dans la population générale, ils peuvent être en nombre significatif dans des populations sélectionnées.

Une série de 85 échantillons à problèmes (contenant 16 sérums à facteur rhumatoïde, plusieurs sérums à interférences de type prozone ou antigènes masqués décrits ci-dessus) a été testée à la fois avec le kit CALAS avec pronase et une méthode EIA de référence. La méthode EIA utilisait un anticorps monoclonal anti-*C. neoformans* et n'était pas affectée par la présence de facteur rhumatoïde ou d'autres interférences non spécifiques. Les données du tableau 1 montrent qu'un seul résultat était discordant lors de la comparaison directe des méthodes EIA et CALAS.

Tableau 1: Résultats de la comparaison entre le kit CALAS (avec pronase) et la méthode EIA utilisant un anticorps monoclonal.

		EIA		
		+	-	
CALAS	+	54	1*	100% de sensibilité
	-	0	30	100% de spécificité

*le résultat discordant a été établi comme étant faiblement positif (titre de 1:8) en faveur de la méthode CALAS lors de son dosage par le kit sur latex du CDC (Center for Disease Control). Ainsi, la spécificité et la sensibilité du coffret CALAS Pronase a été de 100% dans cette étude.

Soixante-dix-sept de ces échantillons à problèmes ont également été dosés par le kit CALAS sans prétraitement à la pronase. Les résultats sans traitement à la pronase comprenaient quatre faux négatifs, deux faux positifs et cinq résultats indéterminés. La sensibilité et la spécificité générale du kit CALAS sans pronase étaient respectivement de 91 et de 92%.

Lorsque la méthode CALAS (avec pronase) a été comparée avec la méthode originale décrite par Stockman et Roberts¹², il y a eu 100% de concordance sur les 18 échantillons positifs et les 16 échantillons négatifs testés. Les titres n'étaient pas significativement différents entre les deux méthodes (avec au maximum une différence d'un facteur deux). De ce fait, les méthodes à la pronase ont montré qu'elles étaient équivalentes et reproductibles.

Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS®)

Sistema de Aglutinación para la detección del Antígeno de Cryptococcus en suero y LCR (líquido cefalorraquídeo)

REF 140100, 140050

IVD

Rx Only

USO INDICADO
El Sistema de Aglutinación en Látex del Antígeno de Cryptococcus (CALAS) es un sistema de test cualitativo y semicuantitativo para la detección de antígenos polisacáridos capsulares de Cryptococcus neoformans en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA
Un test en látex sensible, simple y capaz de detectar los polisacáridos capsulares de C. neoformans en LCR y suero, fue descrito y probado de ser superior en sensibilidad al montaje con Tinta India.

Kaufman y Blumer reportaron que el antígeno de C. neoformans estaba presente tanto en suero como en fluido espinal en el 86% de 330 casos confirmados de meningitis por Cryptococcus. El antígeno fue detectado en muestras de LCR en el 99% de esos 330 casos y solamente en el 87% de las muestras de suero.

Las recientes terapias y estados de enfermedad emergentes han mostrado incrementar la posibilidad de interferencias no específicas en algunas muestras de suero. El pre-tratamiento de las muestras de suero con pronasa antes de utilizar el kit CALAS, reduce la interferencia no específica y realiza la detección de antígenos polisacáridos capsulares de Cryptococcus neoformans.

PRINCIPIOS BIOLOGICOS
El kit CALAS utiliza partículas de látex revestidas de globulina anti-cryptococcal (Látex de Detección). El Látex de Detección reacciona con el antígeno polisacárido de Cryptococcus causando una aglutinación visible. Las partículas de látex revestidas con globulina normal (Látex de Control) actúan como uno de los reactivos de control.

La aglutinación de ambos Látex de Control y Látex de Detección requiere titular la muestra dos veces de forma seriada con ambos reactivos. Un título cuatro veces más alto del Látex de Detección con respecto al Látex de Control, sugiere una enfermedad cryptococcal pero requiere un seguimiento con muestras recogidas más tarde durante el curso de la enfermedad así como los resultados del cultivo.

- REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS
El número máximo de pruebas que se puede obtener con este equipo está indicado en el exterior de la caja.
1. Diluyente de Muestra - Solución salina tamponada con Glicina (pH 8,4 ± 0,1) que contiene albúmina de suero bovino y con timerosal (0,01%) como conservante.
2. Látex de Detección - Partículas de látex estandarizadas revestidas con una dilución óptima de globulina anticriptococal de conejo en solución salina tamponada con Glicina (pH 8,4 ± 0,1) y que contiene menos que con timerosal (0,01%) como conservante.
3. Látex de Control - Partículas de látex estandarizadas revestidas con una dilución óptima de globulina normal de conejo en solución salina tamponada con Glicina (pH 8,4 ± 0,1) y que contiene menos que con timerosal (0,01%) como conservante.
4. Control de Anticuerpo - Suero anti-conejo de cabra liofilizado y que contiene con timerosal (0,01%) como conservante.
5. Control Negativo - Suero humano normal liofilizado que contiene con De Azida Sodica (0,10%) comoconservante.
6. Control Positivo - Antígeno polisacárido de Cryptococcus neoformans purificado y que contiene con timerosal (0,01%) como conservante.
7. Pronasa - Liofilizada con de Azida Sodica (0,10%) como conservante.
8. Tarjetas de Reacción Desechables
9. Fotografía de Referencia de la Reacción
10. Protocolo de la Técnica

- MATERIALES NO PROPORCIONADOS
Agua purificada
Pipetas de 1 x 0,01 mL
Agitador rotativo (opcional)
Palillos aplicadores
Baño de Agua o placa calefatora(56 C y 100 C)
Tubos serológicos pequeños
Soporte de tubos
Rotulador
Pipeteador (o equivalente) de 25 µL, 100 µL, 200 µL

- PRECAUCIONES
1. Todos los reactivos son solo para uso diagnóstico in vitro.
2. Los Controles deben ser procesados cada día antes de procesar las muestras de los pacientes.
3. En cada kit, los reactivos estan relacionados unos con los otros. Pueden obtenerse resultados inapropiados si se intercambian los reactivos con otro kit de diferente número de lote.
4. No utilice reactivos que contengan materia extraña, partículas o agregados que puedan indicar contaminación o inadecuado almacenamiento o manipulación.
5. Las muestras no deben contener bacterias u otros signos obvios de contaminación.
6. Inactivo por calor el Control Negativo cada día que se utilice el equipo.
7. Nunca inactivo por calor el Reactivo de Control de Anticuerpo ya que se podrían originar reacciones de control aberrantes.
8. La azida sódica es un irritante de la piel. Evite que los componentes del kit entren en contacto con la piel.
9. No almacene las muestras en un congelador del tipo sin escarcha.
10. Se debe tener cuidado en no introducir fluido de sinéresis, que está presente en varios tipos de agar, dentro de cualquier muestra antes de procesarla.

ADVERTENCIA
Debido a que ningún método puede ofrecer completa seguridad en la ausencia de virus humanos T-lymforotróficos, virus tipos I/II asociados a linfadenopatía (HIV-I/II), virus de la Hepatitis B, virus de la Hepatitis C u otros agentes infecciosos, los controles deberían ser manipulados al Nivel de Bioseguridad 2 tal como se recomienda que sea aplicado para cualquier muestra de sangre o suero humano potencialmente infeccioso en el manual de "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos", de los Centros de Control de Enfermedades/Institutos Nacionales de Salud.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

 CALAS Pronase Reagent	Palabras de advertencia Peligro indicaciones de peligro H302 - Nocivo en caso de ingestión H316 - Provoca una leve irritación cutánea H334 - Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación Contiene Proteinase, streptomyces griseus Consejos de prudencia - UE (S28, 1272/2008) P261 - Evitar respirar el polvo/ el humo/ el gas/ la niebla/ los vapores/ el aerosol. P304 + P341 - EN CASO DE INHALACIÓN: Si respira con dificultad, transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar P308 + P313 - EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico P342 + P311 - En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓNTOXICOLÓGICA o a un médico
 CALAS Negative Control	Palabras de advertencia Peligro indicaciones de peligro H300 - Mortal en caso de ingestión Consejos de prudencia - UE (S28, 1272/2008) P301 + P310 - EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico P321 - Se necesita un tratamiento específico (véase las instrucciones suplementarias de primeros auxilios en esta etiqueta)

VIDA UTIL Y ALMACENAMIENTO
Almacene el kit CALAS a 2-8 C. Los reactivos estan conservados con 0,01% de timerosal o con 0,10% de azida sódica, no obstante, se deben evitar periodos prolongados a temperatura ambiente. Las suspensiones de látex no deben ser congeladas ya que esto causa apelmazamientos irreversibles.

La Pronasa, una vez reconstituida, puede ser almacenada a 2-8 C durante aproximadamente un mes. Deseche la solución si se convierte nubosa o contaminada. Una vez reconstituida, se sugiere alicuotar la solución de pronasa y congelarla si no va a ser utilizada en un mes. Las alícuotas congeladas de pronasa se pueden conservar a -20 C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial de pronasa. Se debe evitar la congelación y descongelación repetida. No la almacene en un congelador del tipo sin escarcha. La fecha de caducidad de cada kit de CALAS y está indicada en la etiqueta del kit. No continúe usando el kit si los controles incluidos no aportan las reacciones adecuadas. Si eso ocurriera estando los reactivos aún dentro del margen de caducidad indicado en la etiqueta, contacte por favor con la Asistencia Técnica de Meridian.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Reconstituya los siguientes reactivos con el volumen correspondiente indicado de agua desionizada:

- a. Control de Anticuerpo 1,45 mL
- b. Control Negativo 2,40 mL
- c. Pronasas 2,50 mL

La pronasa reconstituida debería ser alícuotada y congelada si no va a ser utilizada en un mes.

Deje reposar los viales reconstituídos durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de agitarlos suavemente. Evite la formación de espuma. El contenido de los viales debe estar completamente diluido antes de ser utilizado. Inactive por calor el **Control Negativo** cada día que realice el test.

Agite cada vial del kit, rotándolo suavemente, antes de cada uso. Las soluciones de látex aparecen como suspensiones homogéneas.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- A. **Líquido Cefalorraquídeo** (Meridian no recomienda que las muestras de LCR sean pretratadas rutinariamente con pronasa. No obstante, recientes evidencias¹⁴ sugieren que el tratamiento con pronasa de la muestras de LCR puede ser útil en algunas muestras).
 1. Recoja la muestra de manera aséptica según los procedimientos aceptados.
 2. Centrifugue a 1000 xg durante 15 minutos para asegurar la separación de todos los glóbulos blancos y de las partículas.
 3. Aspire cuidadosamente el fluido espinal, introdúzcalo en un contenedor estéril y selle este último.
 4. La muestra debe ser procesada de inmediato, refrigerada y conservada congelada a -20 C o añadiendo timerosal a una concentración final del 0,01%.
 5. **Recomendamos que el LCR sea inactivado colocándolo en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos antes de realizar el test.**⁷ Esto tiende a limitar interferencia no específica.
 6. Déjelo enfriar durante 3-4 minutos antes de realizar el test.
- B. **Suero** (Se recomienda que todas las muestras de suero sean tratadas con pronasa tal como se describió anteriormente).
 1. Recoja sangre total de manera aséptica según el procedimiento del centro. La muestra no debe contener anticoagulantes ya que esta circunstancia invalidaría el test.
 2. Deje que la sangre coagule durante 10 minutos o más a temperatura ambiente y dentro de un tubo de recogida.
 3. Centrifugar a 1000 xg durante 15 minutos.
 4. Aspire el suero cuidadosamente, colóquelo dentro de un contenedor estéril y séllelo.
 5. La muestra debe ser procesada de inmediato, refrigerada y conservada congelada a -20 C o añadiendo timerosal a una concentración final del 0,01%.
 6. Añada 200 µL de suero a 200 µL de la solución de pronasa.
 7. Incube la solución suero/pronasa a 56 C durante 15 minutos.
 8. Ponga inmediatamente la solución de suero y pronasa en un baño de agua hirviendo durante cinco minutos para completar la digestión enzimática.
 9. Deje que la solución se enfríe a temperatura ambiente.
 10. La muestra está lista para ser procesada (vea PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA).
- C. **Control Negativo** – Inactive por calor el **Control Negativo** a 56 C durante 30 minutos. Debe ser inactivado por calor cada día que se utilice.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

- 1. Saque las tarjetas suficientes como para ejecutar los controles del día y las muestras de pacientes.
- 2. **NOTA: Los controles no necesitan ser cursados en cada tarjeta con cada muestra de paciente.** Vea **CONTROLES DEL CALAS**.
- 3. En cuanto al sistema adecuado de componer y etiquetar los controles y las muestras de pacientes en el Soporte del Test, consulte el diagrama en el Procedimiento indicado en la etiqueta del kit.
- 4. Sosteniendo el vial del **Control Positivo** en posición vertical, deje caer libremente una gota de reactivo dentro de cada uno de los dos círculos designados.
- 5. Ponga 25 µL de **Control de Anticuerpo y Control Negativo** dentro de los círculos apropiados.
- 6. Ponga 25 µL de muestra de paciente dentro de cada uno de los dos círculos designados (ver Figura).
- 7. Sosteniendo el **Látex de Detección** en posición vertical, deje caer libremente una gota de reactivo dentro de cada uno de los círculos designados.
- 8. De manera similar, añada una gota de **Látex de Control** dentro de cada uno de los círculos designados.
- 9. Mezcle el contenido de los círculos utilizando palillos aplicadores diferentes.
- 10. Haga rotar el soporte manualmente o coloque el soporte en un agitador rotatorio y hágalo rotar a 125 ± 25 rpm durante cinco minutos.
- 11. Lea los resultados inmediatamente y clasifíquelos dentro de una escala con rango desde negativo hasta 4+. Para poder comparar, refiérase a la Fotografía de Referencia de Reacción.
- 12. La gradación de la intensidad de la reacción es como sigue:
 - Negativo (-)** = suspensión homogénea de partículas sin agrupación visible.
 - Una cruz (1+)** = granulación fina en un fondo lechoso.
 - Dos cruces (2+)** = agrupaciones pequeñas pero definidas en un fondo débilmente nuboso.
 - Tres cruces (3+)** = agrupaciones pequeñas y grandes en un fondo claro.
 - Cuatro cruces (4+)** = grandes agrupaciones en un fondo muy claro.

Titulación:

Los pacientes que muestren una reacción 2+ o superior ya sea con el **Látex de Detección** o con el **Látex de Control**, deberían ser titulados con ambos reactivos.

Prepare diluciones seriadas dos veces de las muestras como sigue:

- 1. Deposite 0,25 mL de **Diluyente de Muestra** en cada uno de 5 tubos etiquetados del 1 al 5 y colocados en un rack.
- 2. Utilizando una pipeta limpia, deposite 0,25 mL de muestra del paciente en el tubo # 1 y agítelo bien.
- 3. Transfiera 0,25 mL del tubo # 1 al tubo # 2 y agítelo bien. Continúe este procedimiento de dilución hasta el tubo # 5. Transfiera 0,25 mL del quinto tubo a un tubo "de reserva" por si fueran necesarias más diluciones.

	Tubo	1	2	3	4	5
Muestras tratadas con Pronasa	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	
Muestras no tratadas con Pronasa	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	

- 4. Etiquete la(s) tarjeta(s) desechable(s) para incluir las series de pruebas de titulación en látex para la detección y el control.
- 5. Empezando por el tubo # 4, transfiera 25 µL de esa dilución a cada uno de dos círculos rotulados.
- 6. Repita el paso 5 para los tubos # 3 hasta el # 1. Este procedimiento permite la utilización de una única punta de pipeta para dispensar las cinco diluciones en la tarjeta desechable.
- 7. Añada una gota de **Látex de Detección** suavemente agitado a cada círculo etiquetado de las series de **Látex de Detección**.
- 8. Añada una gota de **Látex de Control** suavemente agitado a cada círculo etiquetado de las series de **Látex de Control**.
- 9. Utilizando diferentes segmentos de un palillo aplicador, mezcle suavemente el contenido de cada círculo extendiendo la acción de mezclar hacia el borde del círculo.
- 10. Haga rotar el soporte manualmente o coloque el soporte en un agitador rotatorio y hágalo rotar a 125 ± 25 rpm durante 5 minutos.
- 11. Lea los resultados inmediatamente y clasifíquelos dentro de una escala con rango desde negativo hasta 4+. Para poder comparar, refiérase a la Fotografía de Referencia de Reacción suministrada.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Reacciones del Control:

El patrón de las reacciones de aglutinación del reactivo control deben ser idéntico al ilustrado en el diagrama ubicado en la parte interior de la tapa de la caja del kit. Si no se obtiene ese patrón significa que uno o más de los reactivos no son satisfactorios o, por otro lado, que los tests fueron realizados inadecuadamente y deben por tanto ser repetidos. En uno u otro caso, los resultados de los tests de pacientes no pueden ser reportados en ausencia de lecturas de control satisfactorias.

El **Control Positivo** debería dar una reacción positiva con el **Látex de Detección** y una reacción negativa con el **Látex de Control**. De este modo se ensaya el **Látex de Detección** para su sensibilidad hacia el antígeno de *Cryptococcus*. Una reacción positiva entre el **Látex de Control** y el **Control Positivo** puede indicar contaminación de uno o ambos viales de control.

El **Control de Anticuerpo** detecta la presencia de globulina de conejo en las partículas de látex. Si el **Control de Anticuerpo** no da una reacción positiva con el **Látex de Control**, significa que uno de los reactivos no es satisfactorio.

El **Control Negativo** debería dar reacciones negativas con ambos **Látex de Detección** y **Látex de Control**. Una reacción positiva con uno u otro reactivo puede indicar una posible contaminación o congelación que a su vez podría producir resultados falsos positivos con las muestras de paciente. También puede darse una reacción positiva si no se ha inactivado por calor el **Control Negativo**.

Muestras de los Pacientes:

- A. **Negativo:** Si en el test de screening inicial frente al **Látex de Detección** se observan reacciones negativas o una reacción 1+, la muestra se reporta como negativa. No obstante, las reacciones 1+ pueden hacer pensar en *cryptococcus*.⁹ Si el estado de un paciente sugiere una infección por *cryptococcus*, se recomienda firmemente el proceso de las subsecuentes muestras y el cultivo. Si se sospecha un efecto prozona, repita el procedimiento de Test de Paciente con ambas diluciones de la muestra 1:10 y 1:100 con el tampón **Diluyente de Muestra** suministrado.
- B. **Positivo:** Si en el test de screening inicial frente al **Látex de Detección** se observan reacciones 2+ o superiores, la muestra se titula con los reactivos de **Látex de Detección** y **Látex de Control**. El título se reporta como la dilución más alta que muestra una reacción 2+ o superior. Aunque títulos de 1:4 o inferiores en LCR son **presuntamente** indicativos de infección del sistema nervioso central por *C. neoformans*, se recomienda firmemente un seguimiento y cultivo adicional. Títulos de 1:8 o superiores en LCR de pacientes con meningitis sugiere firmemente una infección por *C. neoformans*. No obstante, el diagnóstico debería ser confirmado por la identificación del organismo a partir del cultivo o a partir del exámen microscópico de la muestra. El grado de falsos positivos asociados a un suero no tratado con pronasa y con título inferior a 1:8 es del 32%.⁹ Se recomienda firmemente un seguimiento adecuado.
- C. **Positivo con Interferencias No Específicas:** Si el título de la muestra con el **Látex de Detección** es al menos cuatro veces más alto que el título de interferencias no específicas (**Látex de Control**) (p.e. título del **Látex de Detección** de 1:32 y título del **Látex de Control** de 1:8 o inferior), el test debería ser reportado como "Positivo con interferencias no específicas" y se deberían realizar títulos de la muestra frente al **Látex de Detección** y el **Látex de Control**.¹¹
- D. **Test inválido debido a Interferencias No Específicas:** Si el título de la muestra frente al **Látex de Detección** no es al menos cuatro veces más alto que el **Látex de Control**, el test debería ser reportado como "Inválido debido a interferencias no específicas"^{11, 12} (ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO).

El test CALAS parece tener ambos valores diagnóstico y pronóstico ya que la progresión de la enfermedad está habitualmente acompañada por el incremento de los títulos de antígeno. Los títulos decrecientes están habitualmente asociados con una mejoría clínica (con o sin terapia). Una terapia inadecuada viene indicada por títulos crecientes o estacionarios en muestras secuenciales subsecuentes.¹⁰ La presencia del antígeno de *Cryptococcus* en fluidos corporales e pacientes no tratados indica una infección activa. No obstante, en algunos pacientes tratados, los títulos del CALAS permanecen positivos a bajos niveles durante extensos periodos y durante los cuales el organismo ya no puede ser demostrado.

CONTROL DE CALIDAD

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

CONTROL DE LA ACTIVIDAD PRONASA

Cada solución suero/pronasa procesada actúa como control para determinar si la Pronasa CALAS ha perdido actividad. Si se produjera gelatinización o coagulación de la solución suero/pronasa, la Pronasa CALAS habría perdido una actividad significativa y no debería entonces ser utilizada. Tenga en cuenta que la nubosidad aparece habitualmente después de hervir y no es indicativa de un Reactivo de Pronasa deficiente.

CONTROLES DEL CALAS

Solamente se obtienen resultados fiables si se realiza un procesamiento satisfactorio del control el mismo día que se procesan las muestras de los pacientes.

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

El antígeno de *Cryptococcus* en el LCR o suero de pacientes no tratados indica enfermedad activa. Títulos decrecientes indican una respuesta positiva a la quimioterapia en los pacientes tratados. El no decrecimiento de los títulos indica una terapia inadecuada. No obstante, ocasionalmente títulos bajos pueden persistir durante un periodo indefinido en presencia de hongos no viables.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Un test de CALAS negativo no excluye el diagnóstico de una cryptococosis, particularmente si solamente se ha procesado una sola muestra y el paciente muestra síntomas consistentes con una cryptococosis.

Ha sido reportada una reacción falsa-positiva debido a un antígeno de *Trichosporon beigellii* el cual reacciona cruzadamente con el polisacárido capsular de *Cryptococcus neoformans*.¹³ La reacción se dio en una muestra de suero de un paciente con infección por *Trichosporon* diseminada. Aunque la presencia de interferencias no específicas pueden invalidar los resultados del CALAS, no se puede en este caso excluir la posibilidad de una infección cryptococcal ya que la cryptococosis puede darse concomitantemente con otras afecciones (ver PRINCIPIOS BIOLOGICOS).

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El procedimiento de la Pronasa del CALAS ha mostrado reducir efectivamente: 1) las reacciones del factor reumatoide (FR), 2) los efectos prozona a altas concentraciones de antígeno y 3) falsos negativos debidos a aparente enmascaramiento del antígeno después de terapias antibióticas específicas. Aunque estos tipos de muestras son relativamente raros en la población general, algunas poblaciones seleccionadas pueden contener un volumen significativo.

Un grupo seleccionado de 85 muestras de paciente problemáticas (entre ellas 16 sueros con FR y varios sueros de los tipos interferentes "prozona" y "antígeno enmascarado" mencionados anteriormente) fueron ensayadas con ambos kit de CALAS (con pronasa) y un procedimiento EIA de referencia. El EIA utilizaba un monoclonal anticryptococcal y no fue afectado por el FR u otras interferencias no específicas. Los datos de la Tabla 1 muestran que solamente un resultado fue discrepante cuando los procedimientos del EIA y del CALAS fueron directamente comparados.

Tabla 1 – Resultados de la Comparación entre el kit de CALAS (con Pronasa) y el procedimiento EIA basado en Monoclonal

		EIA		
		+	-	
CALAS	+	54	1*	100% sensibilidad
	-	0	30	100% especificidad

*El resultado discrepante fue resuelto como un positivo bajo (título de 1:8) a favor del procedimiento con Pronasa del CALAS cuando la muestra fue ensayada de nuevo con el kit de látex de CDC. De este modo, la sensibilidad y la especificidad del procedimiento del kit de CALAS (con pronasa) fueron ambas del 100% en este estudio.

Setenta y siete de esas muestras problemáticas fueron también ensayadas con el kit de CALAS sin tratamiento con pronasa. Los resultados del especificidad generales del procedimiento sin pronasa del kit de CALAS fueron 91% y 92% respectivamente.

Cuando se comparó el procedimiento del kit de CALAS (con pronasa) directamente con el procedimiento con pronasa original descrito por Stockman y Roberts,¹² hubo un 100% de concordancia con 18 muestras positivas y 16 negativas testadas. Los títulos no fueron significativamente diferentes (dentro del margen de una dilución de 2 veces) entre esos procedimientos con pronasa. De este modo, los procedimientos con pronasa fueron demostrados de ser equivalentes y reproducibles.

Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS®)

Latex-Agglutinationssystem zum Nachweis des Antigens von
Cryptococcus neoformans in Serum und Liquor cerebrospinalis

REF 140100, 140050

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Das Cryptococcus-Antigen Latex-Agglutinationssystem (CALAS) ist ein qualitatives und semiquantitatives Testsystem zum Nachweis des Kapselpolysaccharid-Antigens von *Cryptococcus neoformans* in Serum und Liquor cerebrospinalis.⁸

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

Ein einfacher, empfindlicher Latextest, der das Kapselpolysaccharid von *C. neoformans* im Liquor und im Serum nachweisen kann, hat eine nachweislich höhere Empfindlichkeit als Tuschepräparate.^{2,3} Klinische Studien begründeten den prognostischen Wert des Tests^{4,6,8,9} und zeigten, dass er eine wertvolle Hilfe für die Diagnosestellung bei negativer Kultur ist.⁵

Kaufman und Blumer⁸ berichteten, dass das *C. neoformans* Antigen in 86% von 330 gesicherten Fällen von Cryptococcus-Meningitis sowohl im Serum als auch im Liquor vorkam. Das Antigen war im Liquor von 99% dieser Fälle, aber nur in 87% der Serumproben nachweisbar. Die kombinierte Untersuchung von Serum- und Liquorproben erlaubte den Nachweis des Antigens in jedem gesicherten Fall, parallele serologische Untersuchungen sowohl auf das Antigen als auch auf Antikörper sind zur Absicherung des Nachweises von extrameningealer Kryptokokkose zu empfehlen.

Neu auftretende Krankheiten und Therapien erhöhen nachweislich die Möglichkeit unspezifischer Interferenzen in manchen Serumproben. Die Vorbehandlung der Serumproben mit Pronase vor der Anwendung des CALAS-Tests reduziert unspezifische Interferenzen und erleichtert den Nachweis des Kapselpolysaccharid-Antigens von *Cryptococcus neoformans*.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

CALAS setzt Latexpartikel ein, die mit Anti-Cryptococcus-Globulin (**Testlatex**) beschichtet sind. Das **Testlatex** reagiert mit dem Cryptococcus-Polysaccharid-Antigen unter Ausbildung einer sichtbaren Agglutination. Latexpartikel, die mit normalem Globulin (**Kontrolllatex**) beschichtet sind, dienen als eines der Kontrollreagenzien. Unspezifische Agglutinationen können durch die Anwesenheit von bestimmten Makroglobulinen (z.B. Rheumafaktoren) in der Patientenprobe hervorgerufen werden. Die Behandlung von Serumproben mit Pronase (Meridian Bioscience, Art. N. 140050) entfernt Rheuma- und andere unspezifische Interferenzfaktoren.¹² Diese Makroglobuline sind im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis, Sarkoidose, Zirrhose, Syphilis, Sklerodermie, Psoriasis, Gicht, systemischem Lupus erythematodes und anderen Krankheitszuständen zu finden.^{1,11} Unspezifische Interferenzen werden durch das **Kontrolllatex** Reagenz aufgedeckt.

Wenn eine Agglutination sowohl des **Kontrolllatex** als auch des **Testlatex** vorliegt, muss eine zweifache Titrationsreihe der Probe mit beiden Reagenzien durchgeführt werden. Ein im Vergleich zum **Kontrolllatex** vierfach höherer Titer mit dem **Testlatex** lässt auf eine Cryptococcus-Infektion schließen, bedarf jedoch einer weiteren Beobachtung durch Abnahme von Proben später im Verlauf der Erkrankung und der Anlage einer Kultur.¹⁰ Titer mit weniger als vierfacher Differenz werden als grenzwertige Testergebnisse eingestuft und weitere Nachuntersuchungen werden empfohlen (siehe AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE).

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN

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

1. **Proben-Verdünnungspuffer** - Glycin-gepufferte Kochsalzlösung (pH 8,4 ± 0,1) mit Rinderserumalbumin und Thimerosal (0,01%) als Konservierungsmittel.
2. **Testlatex** - standardisierte Latexpartikel beschichtet mit einer optimalen Verdünnung an Anti-Cryptococcus-Globulin von Kaninchen, in Glycin-gepufferter Kochsalzlösung (pH 8,4 ± 0,1) mit weniger als 0,01% Thimerosal als Konservierungsmittel.
3. **Kontrolllatex** - standardisierte Latexpartikel beschichtet mit einer optimalen Verdünnung an normalem Kaninchen-Globulin, in Glycin-gepufferter Kochsalzlösung (pH 8,4 ± 0,1) mit weniger als 0,01% Thimerosal als Konservierungsmittel.
4. **Antikörper-Kontrolle** - lyophilisiertes Anti-Kaninchen-Serum von Ziegen mit Thimerosal (0,01%) als Konservierungsmittel.
5. **Negativ-Kontrolle** - lyophilisiertes normales menschliches Serum mit Natriumazid (0,10%) als Konservierungsmittel. Jede Spendereinheit, die in diesem Reagenz verwendet wurde, war negativ auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen, anti-Hepatitis C und HIV-1/II Antikörper durch das von der FDA zugelassene Verfahren getestet worden.
6. **Positiv-Kontrolle** - gereinigtes *Cryptococcus neoformans* Polysaccharid-Antigen mit Thimerosal (0,01%) als Konservierungsmittel.
7. **Pronase** - lyophilisiert mit Natriumazid (0,10%) als Konservierungsmittel. Jedes Fläschchen enthält genügend Enzym, um 10 Serumproben vorzubehandeln. Zusätzlich können Sie Pronase bestellen (Bestellnummer: 140050). Mit diesem Reagenz können Sie mindestens 50 Tests durchführen.
8. **Einmal-Testkarten**
9. **Fotografie verschieden ausgeprägter Reaktionen zur Einstufung der Ergebnisse**
10. **Packungsbeilage**

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

gereinigtes Wasser
1x 0,01 mL Pipetten
Agitator (optional)
Spatel
Wasserbad oder Heizblock (56 C und 100 C)

kleine Reagenzröhrchen für die Serologie
Reagenzröhrchen-Ständer
Stift zum Beschriften
25 µL, 100 µL, 200 µL (oder gleichwertige) Pipetten

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro- Diagnostik bestimmt.
2. Die Kontrollen müssen an jedem Analysentag vor den Patientenproben getestet werden.
3. Alle Reagenzien eines Testkits sind aufeinander abgestimmt; es kann zu falschen Ergebnissen kommen, wenn die Reagenzien von Testkits mit unterschiedlicher Chargennummer ausgetauscht werden.
4. Keine Reagenzien mit Fremdstoffen, Partikeln oder Aggregaten, die auf Verunreinigungen, eine falsche Lagerung oder Handhabung hindeuten, verwenden.
5. Die Proben dürfen keine bakteriellen oder andere sichtbare Anzeichen von Verunreinigungen aufweisen.
6. Die **Negative-Kontrolle an jedem Analysentag hitzeinaktivieren**. Anderenfalls können sich bestimmte Globuline neu bilden und können so zu falsch positiven Testergebnissen führen.
7. Das **Antikörper-Kontroll**-Reagenz **niemals** hitzeinaktivieren, da dies zu abweichenden Kontrollreaktionen führen kann.
8. Natriumazid ist hautreizend. Hautkontakt mit den Testbestandteilen vermeiden. Nicht mit Säure mischen, da dies zur Bildung eines Hydrogenazids und eines extrem toxischen Gas führen kann.
9. Die Proben nicht in einem selbstabtauenden Gefriergerät lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben kann die Testergebnisse beeinflussen.
10. Es sollte darauf geachtet werden, dass keine Synärese-Flüssigkeit, die in verschiedenen Agartypen vorkommt, in eine Probe vor der Analyse gelangt, da dies zu verfälschten Ergebnissen führen kann.

WARNUNG

Keine Testmethode kann mit vollständiger Sicherheit das Vorkommen des HI-Virus Typ I und Typ II, des Hepatitis B-Virus, des Hepatitis C-Virus oder andere Erreger ausschließen. Daher sollten die Kontrollen dieses Testkits nach den Biosafety Level 2-Richtlinien für alle potentiell infektiöse menschliche Serum- oder Blutproben gehandhabt werden – wie in dem Handbuch „Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories“, des Centers for Disease Control / National Institutes of Health beschrieben. Manche Reagenzien dieses Testkits enthalten hautreizendes Natriumazid. Das Entsorgen Natriumazid-haltiger Reagenzien in Blei- oder Kupferrohrleitungen kann zur Bildung explosiver Metallazide führen. Dies kann durch Spülen mit großen Wassermengen vermieden werden.

GEFÄHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

 CALAS Pronase Reagent	SIGNALWORT Gefahr Gefahrenhinweise H302 - Gesundheitsschädlich bei Verschlucken H316 - Verursacht leichte Hautreizung H334 - Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen Enthält Proteinase, streptomyces griseus Sicherheitshinweise - Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P261 - Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dampf/ Aerosol vermeiden. P304 + P341 - BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert P308 + P313 - BEI Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen. P342 + P311 - Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen
 CALAS Negative Control	SIGNALWORT Gefahr Gefahrenhinweise H300 - Lebensgefahr bei Verschlucken Sicherheitshinweise - Verordnung (EG) §28, Nr. 1272/2008 P301 + P310 - BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen P321 - Besondere Behandlung (siehe zusätzliche Erste-Hilfe-Angaben auf diesem Etikett)

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Den CALAS-Testkit bei 2-8 C lagern. Die Reagenzien sind mit 0,01% Thiomer als oder 0,10% Natriumazid konserviert; dennoch sollten längere Zeiträume bei Raumtemperatur vermieden werden. Latexsuspensionen dürfen nicht eingefroren werden, da dies irreversible Verklumpungen hervorruft.

Die wiederaufgelöste Pronase kann bei 2-8 C ungefähr einen Monat gelagert werden. Die Lösung verwerfen, wenn sie trübe wird oder verunreinigt ist. Die fertige Pronaselösung sollte aliquotiert und eingefroren werden, wenn sie nicht innerhalb eines Monats aufgebraucht wird. Die Serum/Pronase-Lösung sofort für fünf Minuten in ein Bad mit kochendem Wasser legen, um den enzymatischen Abbau zu beenden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. **Nicht** in einem selbst abtauenden Gefriergerät aufbewahren. Das Haltbarkeitsdatum von jedem CALAS-Testkit steht auf dem Etikett des Kits. Den Kit nicht weiter benutzen, wenn die beigefügten Kontrollen nicht die richtigen Reaktionen zeigen. In diesem Falle und wenn die Reagenzien noch nicht abgelaufen sind, wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von Meridian Bioscience.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Die folgenden Reagenzien mit dem angegebenen Volumen deionisierten Wassers wiederauflösen:

- a. Antikörper-Kontrolle: 1,45 mL
- b. Negativ-Kontrolle 2,40 mL
- c. Pronase 2,50 mL

Die fertige Pronase-Lösung sollte aliquotiert und eingefroren werden, wenn sie nicht innerhalb eines Monats aufgebraucht wird.

Die Fläschchen der fertigen Lösungen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen lassen, bevor sie vorsichtig durchmischt werden. Schaumbildung vermeiden. Die Inhalte müssen sich vor dem Gebrauch vollständig gelöst haben. Die Negativ-Kontrolle an jedem Analysentag hitzeinaktivieren.

Jedes Fläschchen aus dem Kit vor jedem Gebrauch vorsichtig bewegen. Die Latexlösungen müssen eine homogene Suspension darstellen.

PROBENNAHME UND - VORBEREITUNG

- A. Liquor cerebrospinalis (Meridian empfiehlt nicht die routinemäßige Vorbehandlung von Liquorproben mit Pronase. Neue Erkenntnisse¹⁴ lassen jedoch darauf schließen, dass die Pronase-Behandlung von Liquor bei einigen Proben von Nutzen sein kann.)
 - 1. Probe aseptisch nach anerkannten Methoden gewinnen.
 - 2. Bei 1000 xg 15 Minuten lang zentrifugieren, um sicherzustellen, dass weiße Blutkörperchen und andere Partikel entfernt sind.
 - 3. Den Liquor vorsichtig in ein steriles Gefäß aufziehen und verschließen.
 - 4. Die Probe kann entweder sofort weiter bearbeitet werden oder sie kann gekühlt werden oder bei -20 C eingefroren werden oder durch die Zugabe von Thiomersal bis zu einer Endkonzentration von 0,01% konserviert werden.
 - 5. Wir empfehlen die Inaktivierung von Liquor durch fünfminütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad vor jedem Test.⁷ Dies führt zur Einschränkung unspezifischer Interferenzen.
 - 6. 3-4 Minuten vor der Analyse abkühlen lassen.
- B. Serum (Es wird empfohlen, alle Serumproben mit Pronase wie unten beschreiben zu behandeln.)
 - 1. Vollblut aseptisch gemäß den laboreigenen Standards gewinnen. Die Probe darf keine Antikoagulanzen enthalten, da dies den Test ungültig macht.
 - 2. Blut 10 Minuten lang bei Raumtemperatur im Abnahmegefäß gerinnen lassen.
 - 3. Bei 1000 xg 15 Minuten lang zentrifugieren.
 - 4. Serum vorsichtig in ein steriles Gefäß aufziehen und verschließen.
 - 5. Die Probe kann entweder sofort weiter bearbeitet werden oder sie kann gekühlt werden oder durch die Zugabe von Thiomersal bis zu einer Endkonzentration von 0,01% konserviert werden.
 - 6. 200 µL der Serumprobe zu 200 µL der Pronase-Lösung geben.
 - 7. Die Serum-Pronase-Lösung bei 56 C 15 Minuten lang inkubieren.
 - 8. Die Serum/Pronase-Lösung sofort für fünf Minuten in ein Bad mit kochendem Wasser legen, um den enzymatischen Abbau zu beenden.
 - 9. Die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
 - 10. Die Probe ist nun fertig zur Analyse (siehe TESTDURCHFÜHRUNG).
- ACHTUNG: Beim Titrieren beachten, dass die Probe 1:2 mit Pronase-Lösung verdünnt wurde.
- C. Negativ-Kontrolle - Die Negativ-Kontrolle bei 56 C 30 Minuten lang hitzeinaktivieren. Sie muss an jedem Analysentag inaktiviert werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

- 1. Eine ausreichende Anzahl von Testkarten entnehmen, so dass neben den Patientenproben eine Kontrolle pro Testtag durchgeführt werden kann. ACHTUNG: Die Kontrollen müssen nicht auf jeder Karte mit jeder Patientenprobe mitlaufen. Siehe CALAS-KONTROLLEN.
- 2. Nach der Abbildung bei der Testbeschreibung auf der Testkit-Schachtel vorgehen, zeigt sie ein praktisches System zur Vorbereitung und Beschriftung der Kontrollen und Patientenproben auf dem Objektträger.
- 3. Das Fläschchen der Positiv-Kontrolle senkrecht halten und einen freifallenden Reagenztropfen in jeden der beiden vorgesehenen Ringe drücken
- 4. 25 µL der Antikörper-Kontrolle und der Negativ-Kontrolle in die jeweiligen Ringe geben.
- 5. 25 µL der Patientenprobe in jede der beiden vorgesehenen Ringe geben (siehe Abbildung).
- 6. Das Fläschchen des Testlatex senkrecht halten und einen freifallenden Reagenztropfen in jeden der beiden vorgesehenen Ringe drücken.
- 7. In ähnlicher Weise einen Tropfen Kontrolllatex in jeden der vorgesehenen Ringe geben.
- 8. Die Inhalte der Ringe mit jeweils einem eigenen Spatel pro Ring mischen.
- 9. Den Objektträger fünf Minuten lang von Hand wiegen oder auf einem Agitator bei 125 ± 25 rpm lang rotieren lassen.
- 10. Die Ergebnisse sofort ablesen und gemäß einer Skala von negativ bis 4+ einstufen. Zum Vergleich die Fotografie mit Reaktionsbeispielen heranziehen.
- 11. Die Abstufungen der Reaktionsstärken sind wie folgt:
 - negativ (-) = eine homogene Suspension von Partikeln ohne sichtbare Klumpen
 - eins plus (1+) = feine Granulierung gegen einen milchigen Hintergrund
 - zwei plus (2+) = kleine aber deutliche Klumpen gegen einen leicht trüben Hintergrund
 - drei plus (3+) = große und kleine Klumpen gegen einen klaren Hintergrund
 - vier plus (4+) = große Klumpen gegen einen sehr klaren Hintergrund

Titrierung:

- Patientenproben, die eine Reaktionsstufe von 2+ oder höher entweder mit dem Test- oder dem Kontrolllatex zeigen, sollten mit beiden Reagenzien titriert werden. Von den Proben zwei Verdünnungsreihen wie folgt herstellen:
- 1. 0,25 mL Proben-Verdünnungspuffer in jedes von 5 Reagenzröhrchen, die mit 1-5 beschriftet sind, geben und diese in einen Ständer stellen.
- 2. mit einer sauberen Pipette 0,25 mL Patientenprobe in Röhrchen Nr. 1 geben und gut mischen.
- 3. 0,25 mL aus Röhrchen Nr. 1 in Röhrchen Nr. 2 geben und gut mischen. Dieses Verdünnungsverfahren fortsetzen bis zum Röhrchen Nr. 5. 0,25 mL aus dem fünften Röhrchen in ein „Reserveröhrchen“ füllen, da weitere Verdünnungen nötig werden könnten.

Röhrchen	1	2	3	4	5
Pronase-vorbehandelte Probe	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Nicht mit Pronase-vorbehandelte Probe	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

- 4. Die Einwegartikel-Karte(n) mit der Detektionslatex- und der Kontrolllatex-Titrierungsserie des Tests beschriften.
- 5. Mit dem Röhrchen Nr. 4 beginnen, 25 µL dieser Verdünnung in jede der beiden markierten Ringe geben.
- 6. Schritt 5 für die Röhrchen Nr. 3 bis 1 wiederholen. Dieses Vorgehen lässt die Benutzung einer einzigen Pipettenspitze zum Übertragen aller vier Verdünnungsstufen auf den Einmal-Testkarten zu.
- 7. Einen Tropfen des vorsichtig gemischten Testlatex zu jedem beschrifteten Ring der Testlatexserie geben.
- 8. Einen Tropfen des vorsichtig gemischten Kontrolllatex zu jedem beschrifteten Ring der Kontrolllatexserie geben.
- 9. Mit verschiedenen Abschnitten eines Spatels die Inhalte eines jeden Rings sorgfältig vermischen und bis zum Rand des Rings ausbreiten.
- 10. Den Objektträger fünf Minuten lang von Hand wiegen oder auf einem Agitator bei 125 ± 25 rpm rotieren lassen.
- 11. Die Ergebnisse sofort ablesen und gemäß einer Skala von negativ bis 4+ einstufen. Zum Vergleich die Fotografie mit Reaktionsbeispielen heranziehen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Kontrollreaktionen:

Das Muster der Agglutinationsreaktionen mit den Kontrollreagenzien muss mit dem Muster des Diagramms auf dem Innendeckel der Testkit-Schachtel übereinstimmen. Wird dieses Muster nicht erzielt, weist dies auf Unzulänglichkeiten der Reagenzien oder der Testdurchführung hin; der Test muss dann wiederholt werden. In keinem Fall darf ein Patientenergebnis weitergegeben werden, wenn die Kontrollergebnisse nicht zufriedenstellend sind.

Die Positiv-Kontrolle sollte mit dem Testlatex eine positive Reaktion und mit dem Kontrolllatex eine negative Reaktion zeigen. So wird das Testlatex auf seine Sensitivität gegenüber dem Cryptococcus-Antigen überprüft. Eine positive Reaktion zwischen dem Kontrolllatex und der Positiv-Kontrolle kann ein Hinweis auf eine Verunreinigung von einem oder beiden Kontrollfläschchen sein.

Die Antikörper-Kontrolle weist die Anwesenheit von Kaninchen-Globulin auf den Latexpartikeln nach. Wenn die Antikörper-Kontrolle keine positive Reaktion mit dem Kontrolllatex zeigt, ist dies ein Hinweis darauf, dass ein Reagenz unzureichend funktioniert.

Die Negativ-Kontrolle sollte sowohl mit dem Testlatex als auch mit dem Kontrolllatex eine negative Reaktion zeigen. Eine positive Reaktion mit einem der beiden Reagenzien kann auf eine mögliche Verunreinigung oder auf Einfrieren, das bei den Patientenproben falsch positive Ergebnisse verursachen könnte, hinweisen. Eine positive Reaktion kann auch auftreten, wenn die Hitzeinaktivierung der Negativ-Kontrolle vernachlässigt wurde.

Patientenproben:

- A. Negativ: wenn eine negative oder eine 1+-Reaktion beim anfänglichen Screening-Test gegen Testlatex beobachtet wurde, wird die Probe als negativ eingestuft. 1+-Reaktionen lassen jedoch auf Cryptococcus schließen.⁹ Wenn der Zustand des Patienten auf eine Cryptococcus-Infektion schließen lässt, werden weitere Probenanalysen und die Anlage einer Kultur dringend empfohlen. Wird ein Prozonophänomen vermutet, den Patiententest in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung der Probe in dem mitgelieferten Proben-Verdünnungspuffer wiederholen.
- B. Positiv: wenn eine 2+ oder eine stärkere Reaktion gegen das Testlatex im anfänglichen Screening-Test beobachtet wird, wird die Probe mit dem Testlatex und dem Kontrolllatex titriert. Der Titer wird mit der höchsten Verdünnungsstufe, die eine 2+ oder stärkere Reaktion zeigt, angegeben. Obwohl Liquor-Titer von 1:4 oder weniger ein Indizienbeweis für eine C. neoformans-Infektion des zentralen Nervensystems sind, sind zusätzliche Folgeuntersuchungen und das Anlegen einer Kultur dringend zu empfehlen. Liquor-Titer von 1:8 oder mehr bei Patienten mit Meningitis lassen stark auf eine Infektion mit C. neoformans schließen. Die Rate falsch positiver Ergebnisse mit Seren, die nicht mit Pronase vorbehandelt wurden und die Titer von 1:8 oder weniger zeigen, kann bis zu 32% hoch sein.⁹ Geeignete Folgeuntersuchungen sind dringend zu empfehlen.
- C. Positiv mit unspezifischen Interferenzen: wenn der Proben-titer mit dem Testlatex wenigstens 4fach höher als der unspezifische Interferenz-Titer (Kontrolllatex) liegt (z.B. Testlatex-Titer 1:32, Kontrolllatex-Titer 1:8 oder weniger), sollte der Test als „positiv mit unspezifischen Interferenzen“ eingestuft werden; dabei sollten die Proben-titer gegen das Testlatex und das Kontrolllatex angegeben werden.^{1,11}
- D. Ungültig aufgrund unspezifischer Interferenzen: wenn der Proben-titer gegen das Testlatex nicht wenigstens 4fach höher als der gegen das Kontrolllatex ist, sollte der Test als „ungültig aufgrund unspezifischer Interferenzen“ eingestuft werden^{1, 11} (siehe EINSCHRÄNKUNGEN).

Der CALAS-Test hat offensichtlich sowohl diagnostischen als auch prognostischen Wert, da eine fortschreitende Erkrankung gewöhnlich mit ansteigenden Antigen-Titern einhergeht. Abfallende Titer gehen gewöhnlich mit einer klinischen Verbesserung (mit oder ohne Therapie) einher. Eine inadäquate Therapie liegt bei gleichbleibenden oder ansteigenden Titern bei mehreren aufeinanderfolgenden Proben vor.¹⁰ Das Cryptococcus-Antigen in den Körperflüssigkeiten von unbehandelten Patienten zeigt eine aktive Infektion an. Bei einigen behandelten Patienten bleiben die CALAS-Titer jedoch für längere Zeit, während der Organismus nicht länger nachzuweisen ist, positiv auf niedrigem Niveau.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

KONTROLLE DER PRONASEAKTIVITÄT

Anhand jeder fertigen Serum-Pronase-Lösung kann ein möglicher Aktivitätsverlust der CALAS-Pronase überprüft werden. Wenn die Serum-Pronase-Lösung eine Gelatinisierung oder Koagulationen zeigt, hat die CALAS-Pronase deutlich ihre Aktivität verloren und sollte nicht benutzt werden. Zu beachten ist, dass das Kochen zu einer Eintrübung führen kann, die jedoch nicht auf ein schadhafes Pronase-Reagenz hinweist.

CALAS-KONTROLLEN

Verlässliche Ergebnisse werden nur erzielt, wenn ein zufriedenstellender Kontrolllauf am selben Tag durchgeführt wird, an dem die Patientenproben analysiert werden.

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

ERWARTETE WERTE

Das Cryptococcus-Antigen im Liquor oder Serum unbehandelter Patienten zeigt eine aktive Erkrankung an. Abfallende Titer lassen eine positive Antwort auf die Chemotherapie beim behandelten Patienten erkennen. Wenn die Titer nicht abfallen, bedeutet dies eine unzureichende Therapie. Gelegentlich jedoch können niedrige Titer für einen nicht festgelegten Zeitraum bestehen bleiben, wobei nichtlebende Pilze vorliegen.

EINSCHRÄNKUNGEN

Ein negativer CALAS-Test schließt nicht die Diagnose der Kryptokokkose aus, insbesondere wenn nur eine einzige Probe untersucht wurde und der Patient Symptome zeigt, die mit der Kryptokokkose übereinstimmen.

Eine einzelne falsch positive Reaktion aufgrund eines Antigens von *Trichosporon beigelii*, das mit dem *Cryptococcus neoformans*-Kapselpolysaccharid kreuzreagiert, ist bekannt.¹³ Die Reaktion trat in einer Serumprobe eines Patienten mit disseminierter *Trichosporon*-Infektion auf.

Obwohl das Vorkommen unspezifischer Interferenzen die CALAS-Testergebnisse ungültig machen kann, wird dadurch die Möglichkeit einer *Cryptococcus*-Infektion nicht ausgeschlossen, da die Kryptokokkose gleichzeitig mit anderen Erkrankungen auftreten kann (siehe BIOLOGISCHE PRINZIPIEN).

LEISTUNGSMERKMALE

Durch das CALAS Pronase Verfahren konnten nachweislich: 1) Rheumafaktor (RF)-Reaktionen, 2) Prozon-Effekte bei hohen Antigenkonzentrationen und 3) falsch negative Ergebnisse aufgrund einer offensichtlichen Maskierung von Antigenen nach spezifischer Antibiotika-Therapie vermindert werden. Obwohl diese Art von Proben relativ selten in der Gesamtpopulation ist, kann in ausgewählten Populationen eine bedeutende Anzahl vorkommen.

Eine ausgewählte Gruppe von 85 problematischen Patientenproben (einschließlich 16 RF-Seren und mehrerer Seren vom oben beschriebenen Typ mit Prozoneneffekten oder mit maskierten Antigenen) wurde sowohl mit dem CALAS-Test (mit Pronase) als auch mit einer Referenz-ELISA-Methode untersucht. In diesem ELISA wurden monoklonale anti-Kryptokokken-Antikörper verwendet; er wurde weder durch Rheumafaktoren noch durch andere unspezifische Interferenzen gestört. Die Daten in Tabelle 1 zeigen, dass im direkten Vergleich der ELISA und der CALAS-Test nur in einem Ergebnis voneinander abwichen.

Tabelle 1 – Ergebnisse des Vergleichs zwischen dem CALAS-Testkit (mit Pronase) und dem EIA, der auf monoklonalen Antikörpern basiert.

		EIA	
		+	-
CALAS	+	54	1*
	-	0	30
		100% Sensitivität	
		100% Spezifität	

*Das abweichende Ergebnis konnte durch erneute Testung der Probe mit dem CDC-Latex-Test als schwach positiv (Titer 1:8) eingestuft werden, wodurch das CALAS-Pronase-Testergebnis bestätigt wurde. So betrug sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität des CALAS-Testkits (mit Pronase) in dieser Studie 100%.

Siebenundsiebzig dieser problematischen Proben wurden auch mit dem CALAS-Testkit ohne Pronase-Behandlung untersucht. Von den CALAS-Ergebnissen ohne Pronase-Behandlung waren vier falsch negativ, zwei falsch positiv und fünf unbestimmt. Die Gesamtsensitivität und –spezifität des CALAS-Testkits ohne Pronase-Behandlung lagen bei 91 bzw. 92%.

Wenn der CALAS-Test (mit Pronase) direkt mit der ursprünglichen Pronase-Methode nach Stockman und Roberts¹² verglichen wurde, ergab sich eine 100%ige Übereinstimmung bei 18 positiven und 16 negativen getesteten Proben. Die Titer dieser beiden Pronase-Methoden wichen nicht signifikant voneinander ab (bei 2facher-Verdünnung). So konnte bewiesen werden, dass die Pronase-Methoden gleichwertig und reproduzierbar sind.

REFERENCES

1. Bennett, JE and JW Bailey. Control for rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. Amer. J. Clin. Path. 1971;56:360-365.
2. Bennett, JE, HF Hasenclever and BS Tynes. Detection of cryptococcal polysaccharide in serum and spinal fluid: value in diagnosis and prognosis. Trans. Assoc. Am. Physicians 1964;77:145-150.
3. Bloomfield, N, MA Gordon and DF Elmendorf, Jr. Detection of Cryptococcus neoformans antigen in body fluids by latex particle agglutination. Proc. Soc. Exp. Bio. Med. 1963;114:64-67.
4. Diamond, D and E Bennett. Prognostic factors in cryptococcal meningitis. Ann. Of Int. Med. 1974;80:176-181.
5. Goodman, JS, L Kaufman and MG Koenig. Diagnosis of Cryptococcal meningitis: Value of immunologic detection of cryptococcal antigen. New Eng. J. of Med. 1971;285:434-436.
6. Gordon, MA and DK Vedder. Serologic tests in diagnosis and prognosis of cryptococcosis. JAMA 1966;197:961-967.
7. Gordon, MA and EW Lapa. Elimination of rheumatoid factor in the latex test for cryptococcosis. Am. J. Clin. Path. 1974;61:488-494.
8. Kaufman, L and S Blumer. Value and interpretation of serological tests for the diagnosis of cryptococcosis. Appl. Microbiol. 1968;16:1907-1912.
9. Kaufman, L and S Blumer. Cryptococcosis: The Awakening Giant. Proc. Of the Fourth International Conference on the Mycoses. Pan American Health Organization Scientific Publication #356, 1977;pp. 176-182.
10. Palmer, DF, L Kaufman, W Kaplan and JJ Cavellero. Slide Latex Agglutination Test for cryptococcal antigen, in Serodiagnosis of Mycotic Diseases. 1978;Chapter 9, pp.94-103. CC Thomas Publishing. Springfield, IL.
11. Singer, JM. The latex fixation test in rheumatoid diseases: a review. Amer. J. Med. 1961;31:766-799.
12. Stockman, L and GD Roberts. Specificity of the latex test for cryptococcal antigen: a rapid, simple method for eliminating interference factors. J. Clin. Microbiol. 1983;17:945-947.
13. McManus, EJ and JM Jones. Detection of a *Trichosporon beigelii* antigen cross-reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide in serum from a patient with disseminated *Trichosporon* infection. J. Clin. Microbiol. 1985;21:681-685.
14. Gray, LD and GD Roberts. Experience with the Use of Pronase to Eliminate Interference Factors in the Latex Agglutination Test for Cryptococcal Antigen. J. Clin. Microbiol. 1988;26:2450-2451.



SN10100

REV. 04/20



Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244 USA
Telephone: 513.271.3700
Orders/Customer Service:
800.543.1980
Technical Support Center:
800.343.3858
Information Fax: 513.272.5432
Ordering Fax: 513.271.0124



Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe S. r. l
Via dell'Industria, 7
20020 Villa Cortese, Milano
ITALY
Tel: +39 0331 43 36 36
Fax: +39 0331 43 36 16
Email: info@meridianbioscience.eu
WEB: www.meridianbioscience.com/eu

Australian Sponsor
Emergo Australia
Level 20, Tower II
Darling Park
201 Sussex Street
Sydney, NSW 2000
Australia

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.bnl@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.bnl@meridianbioscience.eu

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

Key guide to symbols (Guida ai simboli, Guide des symboles, Guía de símbolos, Zeichenerklärung)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfils the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
			CAUTION: Risk of Danger / ATTENZIONE: Pericolo / AVERTISSEMENT: Risques de danger / Precaución: Peligro / WARNUNG: Risikogefahr
REF	Catalogue number / Numero di catalogo / Référence du catalogue / Numero de catalogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Eingrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD réservés à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenu suffisant pour "n" test / Contenido suficiente para <n> ensayos / Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen	SOLN STOP	Stopping Solution / Soluzione di Stop / Solution d'arrêt / Solución de parada / Stopplösung
	Temperature limitation / Limiti di temperatura / Limites de température / Limite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / testgarät	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 échantillons / Diluyente de muestra / Probenverdünnungspuffer
SUBS	Substrate / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat	BUF WASH 20X	Wash Buffer Concentration 20X / Soluzione dil lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
Rx Only	Prescription Use Only / Per l'uso su prescrizione medica / Uniquement sur prescription / Solo Para Uso Por Receta / verschreibungspflichtig	DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz
	Do not use if package is damaged / Non utilizzare se la confezione è danneggiata / ne pas utiliser si le paquet est endommagé / No use si el paquete esta dañado / Nicht verwenden, wenn die Verpackung beschädigt ist	TUBE	Empty Tube / Provetta vuota / Tube vide / Tubo vacío / Leeres Gefäß

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.