

PREMIER® COCCIDIOIDES

An EIA for the Qualitative Detection of IgM and IgG Antibodies Directed Against the TP and CF Antigens of *Coccidioides immitis* in Serum and Cerebrospinal Fluid (CSF)

REF 603096

IVD

Rx Only

INTENDED USE

The PREMIER *Coccidioides* enzyme immunoassay (EIA) is for the qualitative detection of IgM and IgG antibodies directed against the TP and CF antigens of *Coccidioides immitis* in serum and cerebrospinal fluid (CSF). It is recommended that EIA positive results be confirmed by immunodiffusion assay.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

C. immitis is a major causative agent of deep-seated mycoses. Though endemic in the southwestern United States and Mexico, increased travel to the endemic areas has also increased the incidence in nonendemic areas.^{1,2}

Coccidioidomycosis presents a diagnostic challenge to the physician and laboratorian. Lesions produced by *C. immitis* may be difficult to distinguish from other fungal diseases, or from tuberculous lesions and neoplasms (benign and malignant). Symptoms are often unremarkable and can mimic various pneumonias, sarcoidosis, cancer and other maladies.^{1,2} Culturally and histologically the organisms can be difficult to demonstrate, even after repeated attempts.^{1,2}

Frequently serology offers the only evidence available to form a preliminary diagnosis. Serological evidence can then guide the selection of more definitive diagnostic techniques such as culture or biopsy. Complement fixation, immunodiffusion (ID), and latex agglutination are the primary serologic methods.¹ The tube precipitin (TP) antigen, is a 120 kDa glycoprotein with carbohydrate determinants.^{3,4} Antibodies to the TP antigen can be detected with either the tube precipitin assay or an immunodiffusion system.^{5,8} The presence of antibodies to the TP antigen is interpreted as an indication of acute coccidioidal disease and is primarily an IgM response. The complement fixation (CF) antigen is a heat labile protein. Antibodies to the CF antigen can be detected by either ID or complement fixation systems during the later stages of disease.^{1,2,7,9} The complement fixation assay is used to quantify the IgG response and monitor therapy.^{1,2,7} Latex agglutination offers a sensitive and rapid, negative screening capability, but lacks the specificity to be used without confirmation. No single commercial assay system has provided the possibility of screening for both IgM and IgG responses to both TP and CF antigens.

The PREMIER *Coccidioides* EIA is a rapid test for the detection of IgM and IgG to both TP and CF coccidioidal antigens. When used in conjunction with other laboratory and clinical evidence, the PREMIER *Coccidioides* EIA can be a useful tool to aid in the diagnosis of infection due to *C. immitis*.

BIOLOGICAL PRINCIPLES

The PREMIER *Coccidioides* EIA utilizes a mixture of purified TP and CF antigens adsorbed to microwells to capture relevant IgM and IgG antibodies. Diluted specimen is added to each of two duplicate microwells. If antibodies to the coccidioidal antigens are present, they become bound to the adsorbed antigens. After washing to remove unbound specimen components, an anti-IgM enzyme conjugate is added to one microwell and an anti-IgG enzyme conjugate is added to the other. If patient antibodies are bound, then a sandwich is formed between the adsorbed antigens, patient antibodies, and one or both conjugates. After washing to remove unbound conjugate, a substrate solution is added. Color develops in the presence of bound enzyme conjugate.

REAGENTS/MATERIALS PROVIDED

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

- PREMIER *Coccidioides* Antigen Coated Microwells – Breakaway plastic microwells, each coated with a mixture of TP and CF antigens.
- PREMIER *Coccidioides* Positive Control – Prediluted positive human serum containing 0.10% Sodium Azide as a preservative. Do not dilute further.
- PREMIER *Coccidioides* Sample Diluent – Buffered protein solution containing 0.10% Sodium Azide as a preservative.
- PREMIER 20X Wash Buffer II – Concentrated wash buffer containing 0.2% Thimerosal as a preservative.
- PREMIER *Coccidioides* IgM Enzyme Conjugate – Affinity purified goat anti-human IgM antibodies conjugated to horseradish peroxidase in buffered protein solution containing 0.02% Thimerosal as a preservative.
- PREMIER *Coccidioides* IgG Enzyme Conjugate – Affinity purified goat anti-human IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase in buffered protein solution containing 0.02% Thimerosal as a preservative.
- PREMIER Substrate I – Buffered solution containing peroxide and tetramethylbenzidine.
- PREMIER Stop Solution I – 1M Phosphoric Acid. CAUTION: Avoid contact with skin. Flush with water if contact occurs.
- Microwell Strip Holder

MATERIALS NOT PROVIDED

- Pipettes capable of delivering 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL and 200 µL.
- Test tubes (12 x 75 mm) for dilution of sample
- Distilled or deionized water
- EIA plate reader capable of reading absorbance at 450 nm. A dual wavelength reader is preferred, using a second filter of 630 nm to correct for light scatter
- Squirt bottle or automatic EIA plate washer
- Timer
- Graduated cylinder for making 1X Wash Buffer

PRECAUTIONS

- All reagents are for in vitro diagnostic use only.
- Reagent concentration, incubation times, and temperatures have been optimized for sensitivity and specificity. Best results are obtained by adhering to these specifications.
- Patient specimen and the Positive Control may contain infectious agents. The Positive Control contains human sera which were screened for HBsAg and antibody to HIV-1 and found to be negative. However, no test can offer complete assurance that human blood will not transmit HIV, hepatitis or other infectious agents. Patient specimens, Positive Control and all materials which they contact should be handled at Biosafety Level 2 as recommended in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories". All reagents should be gently mixed and at room temperature before use.
- Do not interchange Microwells, IgM Enzyme Conjugate, IgG Enzyme Conjugate or Positive Control Reagent between different kits. 20X Wash Buffer II, Sample Diluent, Substrate I and Stop Solution I can be interchanged provided they are within their expiration dates at the time of testing.
- Hold reagent vials vertically to insure proper drop size and delivery.
- Replace colored caps on correct vials.
- Avoid skin contact with Stop Solution I (1M Phosphoric acid). Flush with water immediately if contact occurs.
- Avoid splashing when dispensing diluted sample into microwell by placing pipette tip about halfway down the well and dispensing slowly down side of well.
- It is important that microwell washing be performed precisely as directed in assay procedure. **Inadequate washing may be the cause of elevated background in any EIA protocol.**
- Do not use microwells if the foil pouch appears damaged (ie, has holes, punctures).
- Do not use microwells where the desiccant indicator has changed from blue to pink.

HAZARD and PRECAUTIONARY STATEMENTS

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

SHELF LIFE AND STORAGE

The expiration date is indicated on the kit label. Store the kit at 2-8 C and return the kit promptly to the refrigerator after each use. **Unused microwells must be removed from the microwell holder and placed back inside the resealable foil pouch and sealed immediately after opening pouch. It is important to protect strips from moisture.**

REAGENT PREPARATION

Bring the entire kit, including the microwell pouch, to 22-25 C before and during use. **Warming requires at least one hour.** Prepare sufficient 1X Wash Buffer for use by measuring one part 20X Wash Buffer II and diluting with 19 parts purified water. The 1X Wash Buffer can be stored at 22-25 C for up to one month. Discard if the 1X Wash Buffer becomes contaminated. For performing washes, the 1X Wash Buffer can be transferred to a wash or "squirt" bottle. Alternatively, an automated plate washer can be used. NOTE: Automated plate washers tend to waste buffer and may deplete the 20X Wash Buffer II prematurely. Call Technical Services (1-800-543-1980) to order additional PREMIER 20X Wash Buffer II if needed.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum from clotted blood or CSF may be tested with this kit. Heat-inactivated specimens (56 C for 30 minutes) are also acceptable. Do not use bloody CSF. Specimens should be tested as soon as possible, but may be stored up to five days at 2-8 C prior to testing. If longer storage is required, it is recommended that several aliquots of each specimen be frozen (-20 to -80 C) to avoid multiple freeze-thaw cycles. Do not store in a frost-free freezer.

Dilute serum and CSF with Sample Diluent as described below. Performing the dilutions by other schemes may exhaust the supply of Sample Diluent prematurely.

Serum

Dilute serum 1:441 with Sample Diluent as follows:

- Obtain two test tubes for each serum specimen. Transfer 200 µL of Sample Diluent into the first tube and 400 µL into the second tube.
- Transfer 10 µL of serum to the first tube and mix thoroughly.
- Transfer 20 µL of the first dilution into the second tube and mix thoroughly.

CSF

Dilute CSF 1:21 with Sample Diluent as follows:

- Obtain a test tube for each CSF specimen and transfer 400 µL of Sample Diluent into each tube.
- Transfer 20 µL of CSF into the dilution tube and mix thoroughly.

TEST PROCEDURE

NOTE: Each microwell is coated with both TP and CF antigens. It is recommended that both IgM and IgG assays be performed simultaneously for all sera.

- Snap off a sufficient number of microwells for samples and controls and insert them into the microwell holder. Record sample positions, as in the example below. **Avoid testing more specimens than can be loaded in 6 minutes in step 3.**

	1	2	3	4	5	6	
A	PC	SD	Pt. #1	Pt. #2	Pt. #3	Pt. #4	IgM
B	PC	SD	Pt. #1	Pt. #2	Pt. #3	Pt. #4	IgG

- Add 100 µL of Positive Control (PC) to each of 2 separate microwells (A1 and B1) and 100 µL of Sample Diluent (SD) to each of 2 separate microwells (A2 and B2). **The latter wells are considered Negative Controls.**
- Add 100 µL of each specimen (diluted as described in the previous section) to 2 separate microwells (in rows A and B, as needed). Caution should be taken not to cross contaminate samples, as this could cause erroneous results. Mix by gently shaking 10-15 seconds on the countertop.
- Incubate at 22-25 C for 30 minutes after the addition of all specimens and controls.
- Hold the plate firmly from the bottom and gently squeeze it.
 - Dump plate contents firmly into a biohazard receptacle and strike the inverted plate firmly on a clean stack of paper towels or other absorbent material.
 - Fill all wells with 1X Wash Buffer (use wash bottle or other device) directing stream of buffer to the sides of the wells to avoid foaming. Dump the plate contents and strike plate on towels.
 - Repeat wash cycle (step 5b) 2 times for a total of 3 washes. After the final wash, strike plate on fresh towels hard enough to remove as much excess wash buffer as possible but do not allow wells to completely dry at any time.
- Add 2 drops of IgM Enzyme Conjugate to the microwells of row A, or as required according to the number of specimens.
- Add 2 drops of IgG Enzyme Conjugate to the microwells of row B, or as required according to the number of specimens. Mix by gently shaking 10-15 seconds on the countertop.
- Incubate at 22-25 C for 30 minutes after the Enzyme Conjugates have been added to all microwells.
- Remove Enzyme Conjugates from each microwell and wash 3 times as in step 5.
- Add 2 drops of Substrate I to each microwell. Start timer with addition of Substrate to first well. Mix by gently shaking 10-15 seconds on the counter top.
- Incubate at 22-25 C for 5 minutes.
- Add 2 drops of Stop Solution I to each microwell in the same order as step 10. Mix by gently shaking 10-15 seconds on the counter top and wait 2 minutes before reading. Readings should be made within 15 minutes.
- Carefully, wipe the underside of the microwells with a lint free tissue and measure the absorbance.
 - A dual wavelength reader is preferred, with absorbance read at 450 nm and 630 nm. BLANK ON AIR.
 - If a single wavelength reader is used, read the absorbance at 450 nm as follows:
 - Blank on air.
 - Read the Negative Control microwell(s), value(s) should be < 0.100.
 - Then reblank the reader on the Negative Control microwell(s) to compensate background.
- Disinfect and retain microwell holder. Discard used assay materials as biohazardous waste.

INTERPRETATION OF RESULTS

Results

Negative = Absorbance Value < 0.150
Indeterminate = Absorbance Value ≥ 0.150 but ≤ 0.199
Positive = Absorbance Value ≥ 0.200

A negative result with both IgM and IgG indicates that antibody to *C. immitis* antigens is either absent, below the level of detection of the assay or the specimen was obtained too early in the response. A positive result with either IgM or IgG implies the presence of antibody to *C. immitis* antigens and a positive response with either conjugate should be reported. An early acute phase patient may only present an IgM response, while the chronic or convalescent patient may only present an IgG response.

Retest specimens which yield an indeterminate result and report the result of the retest. If the retest result is still indeterminate, a second specimen should be obtained. Extremely strong positive reactions may yield a purple precipitate within a few minutes of stopping the reaction. Absorbances obtained with such reactions may be lower than expected but will still be positive.

QUALITY CONTROL

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

- The Positive and Negative Controls must be assayed with each batch of patient specimens to provide quality assurance of the reagents.
- The Negative Control (Sample Diluent) microwells should yield an A₄₅₀ value < 0.100 with both IgM and IgG Conjugates when blanked on air or an A_{450,630} value < 0.050. Negative values ≤ -0.005 may indicate a problem with EIA plate reader.
- The Positive Control microwells should have a definite yellow color and yield an A₄₅₀ or A_{450,630} value ≥ 0.500 and ≤ 2.500 with both IgM and IgG Conjugates.
- At the time of each use, kit components should be visually examined for obvious signs of microbial contamination, freezing, or leakage. A flaky precipitate may form in the Sample Diluent which will not affect its performance.
- It is suggested that the results of each quality control check be recorded in an appropriate log book to maintain high quality testing procedures and compliance with regulatory agencies.

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

Expected values for a given population should be determined for each laboratory. The rate of positivity may vary depending on geographic location, method of specimen collection, handling and transportation, test employed and general health environment of patient population under study.

The PREMIER *Coccidioides* EIA test has shown positive rates of 42.5%, 4.0%, and 2.5% from three prospective clinical studies. The frequency of coccidioid infection was higher from the endemic region than the nonendemic region.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- The PREMIER *Coccidioides* EIA is intended for use with CSF or serum specimens. Use of this assay is not recommended with other specimens.
- A negative result with both IgM and IgG does not preclude diagnosis of coccidioidomycosis, particularly if only a single specimen has been tested and the patient shows symptoms consistent with a positive diagnosis.
- A positive result with either IgM or IgG implies the presence of antibody to *C. immitis*. Positive EIA results should be confirmed by immunodiffusion assay. However, because of the relative insensitivity of the ID procedures, and ID negative does not preclude the possibility of coccidioidomycosis.¹¹ Diagnosis of coccidioidomycosis is based on laboratory and clinical findings as well as the presence of antibody.
- Positive results with either IgM or IgG (but not both) also suggest coccidioid infection, but in different disease states. An early acute phase patient may only present an IgM response, while the chronic or convalescent patient may only present an IgG response. Such EIA results should be compared with patient symptoms to determine whether there is a logical correlation. Because the IgM and IgG results do not confirm each other in these cases, additional confirmation may be prudent, particularly if symptoms do not correlate with the single EIA result. Positive results with both IgM and IgG strongly suggest active disease with a high degree of confidence since the assays confirm each other.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The PREMIER *Coccidioides* EIA was evaluated at two Medical Centers in an endemic area, one central reference laboratory and Meridian Bioscience, Inc. Of the 1,315 samples submitted for *Coccidioides* testing, 1,242 were sera and 73 were CSF. A comparison of the results obtained with the EIA and complement fixation methods are presented in the tables below. When the EIA and complement fixation results did not agree, immunodiffusion (ID) and/or tube precipitin (TP) results were used to resolve the discrepancies. The EIA results for IgM and IgG are presented separately and combined. For the combined comparison, a specimen was considered positive if either IgM, IgG or both results were positive. The results indicate that the greatest sensitivity is obtained when both IgM and IgG EIA assays are performed. This observation is consistent with the notion that patients in the early acute phase may present with only an IgM response while the chronic or convalescent patient may present with only an IgG response.

PREMIER EIA IgM Only	Complement Fixation		Resolved	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	160	67	189	38
Neg	75	971	65	981
Ind	10	32	12	30

n=1,315

	vs. Comp. Fix.	vs. Resolved
Relative Sensitivity	68.1%	74.4%
Relative Specificity	93.5%	96.3%
Overall Agreement	86.0%	89.0%

When the discrepancies between the EIA IgM results and complement fixation were resolved, 29 of the 67 specimens which were positive by EIA but negative by complement fixation were confirmed to be positive by ID assays. Ten of the 75 specimens negative by EIA and positive by complement fixation were ID negative.

PREMIER EIA IgG Only	Complement Fixation		Resolved	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	214	69	248	35
Neg	24	987	22	989
Ind	7	14	8	13

n=1,315

	vs. Comp. Fix.	vs. Resolved
Relative Sensitivity	89.9%	91.9%
Relative Specificity	93.5%	96.6%
Overall Agreement	91.3%	94.1%

When the discrepancies between the EIA IgG results and complement fixation were resolved, 34 of the 69 specimens which were positive by EIA but negative by complement fixation were confirmed to be positive by ID assays. Two of the 24 specimens negative by EIA and positive by complement fixation were ID negative.

PREMIER EIA IgM and IgG	Complement Fixation		Resolved	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	228	99	267	60
Neg	14	934	7	941
Ind	3	37	3	37

n=1,315

	vs. Comp. Fix.	vs. Resolved
Relative Sensitivity	94.2%	97.4%
Relative Specificity	90.4%	94.0%
Overall Agreement	91.1%	94.7%

When the discrepancies between the EIA IgG and IgM results and complement fixation were resolved, 39 of the 99 specimens which were positive by EIA but negative by complement fixation were confirmed to be positive by ID assays. Seven of the 14 specimens negative by EIA and positive by complement fixation were ID negative. At one site in the endemic area, three patients were determined to be EIA positive, while each was negative by all of the classical serologic methods. Retesting of a subsequent specimen from 2-14 days later, confirmed that these patients had acute disease and the EIA had correctly demonstrated antibody at an earlier stage than the classical methods.

REPRODUCIBILITY

Intra-assay Variability – Twelve replicates of three different known positive sera were tested for both IgM and IgG in one assay to determine the intra-assay reproducibility. All 12 replicates of each specimen were performed using a single 1:441 dilution.

Sample	Intra-assay Variability		
	Mean IgM Abs.	S.D.	% C.V.
1	0.478	0.026	5.4
2	0.477	0.033	6.9
3	0.928	0.045	4.8
Sample	Intra-assay Variability		
	Mean IgG Abs.	S.D.	% C.V.
1	2.179	0.072	3.3
4	1.132	0.069	6.1
5	0.511	0.048	9.4

Inter-assay Variability – Three known positive specimens were tested for IgM and IgG in multiple assay runs by two or more operators. Each operator performed the 1:441 dilutions and then performed the assay protocol. Each run consisted of triplicates of each specimen run by a single operator.

Sample	Inter-assay Variability		
	Mean IgM Abs	S.D.	% C.V.
6	0.532	0.033	6.1
7	0.562	0.064	11.4
8	1.020	0.071	7.0
Sample	Inter-assay Variability		
	Mean IgG Abs.	S.D.	% C.V.
6	2.082	0.170	8.2
9	1.147	0.080	7.0
10	0.520	0.069	13.4

CROSSREACTIVITY

Numerous reports have noted a significant cross-reaction problem with complement fixation, latex, and other EIA assays for coccidioid antibodies,¹⁻⁴ particularly with patients suffering from other fungal diseases such as Histoplasmosis, Blastomycosis, and Aspergillosis. The data below demonstrate that when specimens serologically positive for antibodies to various organisms as well as specimens containing rheumatoid factor, antinuclear antibodies of Cryptococcal antigen were tested with PREMIER *Coccidioides*, the overall specificity was 95.7%.

	Mean IgM	Mean IgG	Pos./Total	Specificity
<i>Histoplasma</i>	0.043	0.041	4/79	95%
<i>Blastomyces</i>	0.026	0.025	0/9	100%
<i>Aspergillus</i>	0.062	0.039	2/20	90%
Rheumatoid Factor	0.060	0.015	0/10	100%
Antinuclear Abs	0.026	0.010	0/7	100%
<i>Mycoplasma</i>	0.026	0.008	0/11	100%
<i>Cryptococcus</i>	0.007	0.008	0/8	100%
Influenza	0.016	0.009	0/5	100%
HIV	0.008	0.031	1/15	93%

ITALIANO

PREMIER® COCCIDIOIDES

Test Immunoenzimatico su piastra per la ricerca qualitativa di anticorpi IgM ed IgG diretti contro gli antigeni TP e CF di *Coccidioides immitis* nel Siero e nel Liquido CerebroSpinale (CSF)

REF 603096

IVD

Rx Only

FINALITA' D'USO

Il test immunoenzimatico (EIA) PREMIER *Coccidioides* viene utilizzato per la rilevazione qualitativa degli anticorpi IgM e IgG diretti contro gli antigeni TP e CF di *Coccidioides immitis* nel siero e nel liquido cerebrospinale (CSF). Si consiglia di confermare i risultati positivi dell'EIA con un saggio per immunodiffusione.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

C. immitis è un importante agente responsabile delle micosi profonde. Endemico nel Messico e negli Stati Uniti sud-occidentali, l'aumento dei viaggi in queste aree ne ha aumentato l'incidenza anche nelle aree non endemiche.^{1,2}

La coccidioidomycosi rappresenta una sfida diagnostica per i fisici e gli addetti ai laboratori. Le lesioni prodotte da *C. immitis* non sono facilmente distinguibili da altre malattie fungine o lesioni tubercolari e neoplasmali (benigni e maligni). I sintomi sono spesso trascurabili e simili a quelli di polmonite, sarcoidosi, cancro e altre malattie.^{1,2} Da un punto di vista culturale e istologico, è difficile che gli organismi possano manifestarsi, anche dopo ripetuti tentativi.^{1,2}

Di frequente la sierologia offre l'unica prova disponibile per formulare una diagnosi preliminare. Le prove sierologiche possono poi guidare la scelta di tecniche diagnostiche più definitive quali la coltura o la biopsia. La fissazione del complemento, l'immunodiffusione (ID) e l'agglutinazione al lattice sono i principali metodi sierologici.¹ L'antigene TP è una glicoproteina di 120 kDa con determinanti dei carboidrati.^{3,4} Gli anticorpi dell'antigene TP possono essere individuati con un'analisi del TP o con un sistema di immunodiffusione.^{5,8} La presenza di anticorpi dell'antigene TP indica una malattia coccidioidale acuta e costituisce fondamentalmente una risposta IgM. L'antigene CF (fissazione del complemento) è una proteina labile al calore. Gli anticorpi dell'antigene CF possono essere individuati da sistemi di fissazione del complemento o ID negli stadi finali della malattia.^{1,2,7,9} Il test della fissazione del complemento viene usato per quantificare la risposta IgG e per monitorare la terapia.^{1,2,7} Il sistema di agglutinazione al lattice offre la possibilità di eseguire uno screening negativo, sensibile e rapido, ma manca di specificità, per cui non può essere utilizzato senza test di conferma. Nessun sistema di analisi commerciale ha fornito la possibilità di eseguire uno screening per le risposte IgM e IgG agli antigeni TP e CF.

Il PREMIER *Coccidioides* EIA è un test rapido ELISA per la determinazione degli anticorpi IgM e IgG per gli antigeni coccidioidali TP e CF. Quando usato insieme ad altre prove cliniche e di laboratorio, il PREMIER *Coccidioides* EIA può essere uno strumento utile nella diagnosi di infezioni causate da *C. Immitis*.

PRINCIPIO BIOLOGICI

Il PREMIER *Coccidioides* EIA utilizza un insieme di antigeni TP e CF purificati, adsorbiti in micropozzetti per individuare gli anticorpi IgM e IgG più rilevanti. Un campione diluito viene aggiunto a due micropozzetti in duplicato. Se gli anticorpi degli antigeni coccidioidali sono presenti, si legano agli antigeni adsorbiti. Dopo aver eseguito un lavaggio per eliminare i componenti non legati del campione, un coniugato enzimatico anti-IgM viene aggiunto a un micropozzetto e un coniugato enzimatico anti-IgG viene aggiunto all'altro. Se gli anticorpi del paziente sono legati, si crea un doppio strato tra gli antigeni adsorbiti, gli anticorpi del paziente e uno o entrambi i coniugati. Dopo aver eseguito un lavaggio per rimuovere il coniugato non legato, viene aggiunta una soluzione contenente il substrato. Il colore appare in presenza di coniugati enzimatici legati.

REAGENTI/MATERIALI FORNITI

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

- PREMIER *Coccidioides* Micropozzetti rivestiti con antigeni – Micropozzetti in plastica frazionabili, ciascuno rivestito con una miscela di antigeni TP e CF.
- PREMIER *Coccidioides* Controllo Positivo – Siero umano positivo prediluito contiene Sodio Azide (0,10%) come conservante. Non diluire ulteriormente.
- PREMIER *Coccidioides* Diluente del campione – Soluzione proteica tampon contiene Sodio Azide (0,10%) come conservante.
- PREMIER Tampone di lavaggio II (20X) – Soluzione tampone 20X volte concentrata, contiene thimerosal (0,2%) come conservante.
- PREMIER *Coccidioides* Coniugato enzimatico IgM – Anticorpi anti-IgM umane (da capra) purificati per affinità, coniugati con perossidasi di rafano in soluzione proteica tamponata contiene thimerosal (0,02%) come conservante.
- PREMIER *Coccidioides* Coniugato enzimatico IgG – Anticorpi anti-IgG umane (da capra) purificati per affinità, coniugati con perossidasi di rafano in soluzione proteica tamponata contiene thimerosal (0,02%) come conservante.
- PREMIER Substrato I – Soluzione tampone contenente perossidasi e tetrametilbenzidina.
- PREMIER Soluzione di Stop I – 1 M acido fosforico. ATTENZIONE: Evitare il contatto con la pelle. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.
- Contenitore a strisce di micropozzetti

MATERIALI NON FORNITI

1. Pipette con capacità di distribuzione di 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL e 200 µL.
2. Provette (12 x 75 mm) per la diluizione del campione
3. Acqua distillata o deionizzata
4. Lettore di piastre EIA capace di leggere un'assorbanza a 450 nm. È consigliabile un lettore a lunghezza d'onda doppia con un secondo filtro a 630 nm per evitare la dispersione della luce
5. Bottiglia con spruzzetta o sistema di lavaggio piastre EIA automatico
6. Orologio
7. Cilindro graduato per la preparazione della Tampone di lavaggio 1X

PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti sono esclusivamente per uso diagnostico in vitro.
2. La concentrazione dei reagenti, i tempi di incubazione e le temperature sono stati ottimizzati per sensibilità e specificità. I migliori risultati si ottengono rispettando queste specifiche.
3. Il campione del paziente e il controllo positivo possono contenere agenti infettivi. Il controllo positivo contiene sieri umani sottoposti a screening per l'HBsAg e gli anticorpi dell'HIV-1, risultati negativi. Tuttavia, nessun test può garantire del tutto che il sangue umano non trasmetta l'HIV, l'epatite o altri agenti infettivi. I campioni del paziente, il controllo positivo e tutti i materiali di contatto devono essere trattati al livello di biosicurezza 2 come raccomandato nel manuale del CDC/NIH "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories".
4. Tutti i reagenti devono essere mescolati delicatamente e a temperatura ambiente prima dell'uso.
5. Non mischiare il Coniugato Enzimatico IgG ed IgM, ed il controllo positivo appartenenti a kit di lotti differenti; il diluente del campione II, il Substrato I e la Soluzione di Stop I possono essere utilizzati indipendentemente dal lotto, purché utilizzati prima della scadenza.
6. Tenere le fiale dei reagenti in posizione verticale per un corretto dosaggio e distribuzione delle gocce.
7. Mettere i tappi colorati sulle rispettive fiale.
8. Evitare il contatto della Soluzione di Stop I (1 M acido fosforico) con le pell. In caso di contatto, lavare immediatamente con acqua.
9. Durante la distribuzione del campione diluito nel micropozzetto, evitare gli spruzzi, posizionando la punta della pipetta a metà del pozzetto e distribuire il liquido lentamente sul lato del pozzetto.
10. È importante che il lavaggio del micropozzetto sia eseguito con precisione, come illustrato nella procedura di analisi. **Un lavaggio errato potrebbe causare un fondo elevato in tutti i protocolli EIA.**
11. Non utilizzare le strisce dei pozzetti se la busta di alluminio appare danneggiata (se contiene ad esempio segni e fori).
12. Non utilizzare le strisce dei pozzetti se l'indicatore dell'essiccante ha cambiato colore, da blu a rosa.

DICHIARAZIONI DI PERICOLO E PRUDENZA

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

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit. Conservare il kit a una temperatura compresa tra 2 e 8 C e rimettere il kit in frigorifero dopo l'uso. **Rimuovere i micropozzetti inutilizzati dal relativo contenitore, riporli nel sacchetto di alluminio e sigillarli immediatamente. È importante proteggere le strisce dall'umidità.**

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Portare l'intero kit, incluso il sacchetto dei micropozzetti, a una temperatura compresa tra 22 e 25 C prima e durante l'uso. **Il riscaldamento richiede almeno un'ora a temperatura ambiente.** Preparare tamponi di lavaggio 1X sufficiente, misurando una parte di tampone di lavaggio II (20X) e diluendola con 19 parti di acqua purificata. Il tampone di lavaggio 1X può essere conservato a 22-25 C fino ad un mese. Eliminare il tampone di lavaggio 1X se risulta contaminato. Per eseguire i lavaggi, il tampone di lavaggio 1X può essere trasferito in una bottiglia di lavaggio o "spruzzetta". In alternativa, è possibile utilizzare un lavatore automatico di piastre. **NOTA:** Con i lavatori di piastre automatici parte della soluzione tamponata va sprecata, per cui la soluzione potrebbe terminare prima del tempo. Per ordinare altro Tampone di Lavaggio II (20X), rivolgersi direttamente a Meridian Bioscience Europe.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Con questo test è possibile analizzare siero da sangue coagulato o CSF. È possibile utilizzare anche i campioni inattivati dal calore (56 C per 30 minuti). Non utilizzare CSF con tracce di sangue. I campioni devono essere analizzati prima possibile, ma possono essere conservati fino a cinque giorni prima di effettuare il test ad una temperatura compresa tra 2 e 8 C. Se è necessario conservare i campioni per un periodo di tempo più lungo, si consiglia di congelare (da -20 a -80 C) più aliquote di ciascun campione per evitare uno scongelamento multiplo. Non conservare in un freezer no frost.

Diluire il siero e il CSF con il diluente del campione come descritto di seguito. Se le diluizioni vengono preparate seguendo schemi diversi, il diluente del campione può finire prima del tempo.

Siero

Diluire il siero 1:441 con il diluente del campione come riportato di seguito:

1. Procurarsi due provette per ciascun campione di siero. Trasferire 200 µL di diluente del campione nella prima provetta e 400 µL nella seconda.
2. Trasferire 10 µL di siero nella prima provetta e mescolare accuratamente.
3. Trasferire 20 µL di CSF nel tubo di diluizione e mescolare accuratamente.

CSF

Diluire il CSF 1:21 con il diluente del campione come segue:

1. Procurarsi una provetta per ciascun campione di CSF e trasferire 400 µL di diluente del campione in ciascuna provetta.
2. Trasferire 20 µL di CSF nella provetta di diluizione e mescolare accuratamente.

PROCEDURA DEL TEST

NOTA: Ciascun micropozzetto è riestito con antigeni TP e CF. Si consiglia di eseguire i dosaggi IgM e IgG contemporaneamente per tutti i sieri.

1. Staccare un numero sufficiente di micropozzetti per i campioni e i controlli e inserirli nel supporto per micropozzetti. Registrare le posizioni dei campioni come mostrato nel seguente esempio. **Evitare di analizzare più campioni di quelli che possono essere dispensati in 6 minuti nel passaggio 3.**

	1	2	3	4	5	6	
A	CP	DC	Paz. n. 1	Paz. n. 2	Paz. n. 3	Paz. n. 4	IgM
B	CP	DC	Paz. n. 1	Paz. n. 2	Paz. n. 3	Paz. n. 4	IgG

2. Aggiungere 100 µL di controllo positivo (CP) in duplicato a ciascuno dei 2 micropozzetti (A1 e B1) e 100 µL di diluente del campione (DC) in duplicato a ciascuno dei 2 micropozzetti (A2 e B2). **Questi ultimi due pozzetti vengono considerati controlli negativi.**
3. Aggiungere 100 µL di ciascun campione (diluente come descritto nella sezione precedente) in duplicato ai 2 micropozzetti (nelle righe A e B). Per evitare risultati errati, fare attenzione alla cross-contaminazione tra pozzetti. Mescolare agitando delicatamente per 10-15 secondi sul piano d'appoggio.
4. Dopo aver dispensato tutti i campioni e i controlli, Incubare a 22-25 C per 30 minuti.
5. Tenere saldamente la piastra dal fondo e svuotarla con cautela.
 - a. Versare tutto il contenuto della piastra in un recipiente per materiali biologicamente pericolosi, dopo di che sbattere con forza la piastra invertita su salviette di carta o altri materiali assorbenti.
 - b. Riempire tutti i pozzetti di tampone di lavaggio 1X (utilizzare la spruzzetta o altri dispositivi) dirigendo il flusso della soluzione sui lati dei pozzetti per evitare la formazione di schiuma. Versare il contenuto della piastra dopo di che sbattere con forza la piastra invertita su salviette di carta o altri materiali assorbenti.
 - c. Ripetere il ciclo di lavaggio (passo 5b) 2 volte per un totale di 3 lavaggi. Dopo il lavaggio finale, sbattere la piastra su salviette pulite, in modo abbastanza energico da rimuovere tutto il tampone di lavaggio residuo. Non lasciare asciugare del tutto i pozzetti.
6. Aggiungere 2 gocce di coniugato enzimatico IgM ad ognuno dei micropozzetti della riga A.
7. Aggiungere 2 gocce di coniugato enzimatico IgG ad ognuno dei micropozzetti della riga B. Mescolare agitando delicatamente per 10-15 secondi sul piano di appoggio.
8. Dopo aver aggiunto i coniugati enzimatici a tutti i micropozzetti incubare per 30 minuti a una temperatura di 22-25 C.
9. Rimuovere i coniugati enzimatici da ciascun micropozzetto e lavare 3 volte i micropozzetti come nel passaggio 5.
10. Aggiungere 2 gocce di Substrato I a ciascun micropozzetto. Avviare il timer quando si aggiunge il substrato al primo pozzetto. Mescolare agitando delicatamente per 10-15 secondi sul piano di appoggio.
11. Incubare a una temperatura di 22-25 C per 5 minuti.

12. Aggiungere 2 gocce di Soluzione di Stop I a ciascun micropozzetto seguendo lo stesso ordine del passaggio 10. Mescolare agitando delicatamente per 10-15 secondi sul piano di appoggio e attendere 2 minuti prima della lettura. Le letture devono essere eseguite entro 15 minuti.
13. Con molta cautela pulire la parte inferiore dei micropozzetti con un panno senza pelucchi e misurare l'assorbanza.
 - a. È preferibile un lettore a doppia lunghezza d'onda, con lettura delle assorbanze a 450 nm e 630 nm. **AZZERARE IL LETTORE (BIANCO ARIA).**
 - b. Se si utilizza un lettore a lunghezza d'onda singola, leggere l'assorbanza a 450 nm come segue:
 - i. Azzerare il lettore (bianco aria).
 - ii. Leggere i micropozzetti del controllo negativo, i valori devono essere < 0,100.
 - iii. Azzerare nuovamente il lettore sui micropozzetti del controllo negativo per compensare il fondo.
14. Disinfettare e conservare il supporto dei micropozzetti. Eliminare i materiali di analisi utilizzati, quali rifiuti biologicamente pericolosi.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati

Negativo = Valore di assorbanza < 0,150
Indeterminato = Valore di assorbanza ≥ 0,150 ma ≤ 0,199
Positivo = Valore di assorbanza ≥ 0,200

Un risultato negativo sia con IgM che gli anticorpi diretti contro gli antigeni di *C. immitis* sono assenti o in quantitativo inferiore al Limite di Rilevazione del test oppure che il campione è stato prelevato troppo presto dall'insorgere della risposta antigenica. Un risultato positivo sia per il IgM che per il IgG implica la presenza degli anticorpi diretti contro gli antigeni *C. immitis* e deve essere riportata una risposta positiva con entrambi i coniugati. Un paziente all'inizio della fase acuta può presentare solo una risposta IgM, mentre un paziente cronico o convalescente può presentare solo una risposta IgG.

Analizzare nuovamente i campioni che risultino indeterminati e registrare tutti i risultati. Se il risultato è ancora indeterminato, è necessario procurarsi un altro campione. Reazioni positive estremamente forti possono provocare la formazione di un precipitato viola dopo pochi minuti dall'aggiunta della Soluzione di Stop. I valori di assorbanza ottenuti con tali reazioni possono essere inferiori a quelli attesi, ma devono essere considerati positivi.

CONTROLLO QUALITÀ

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

1. I controlli positivi e negativi devono essere eseguiti su tutte le sedute per garantire la qualità dei reagenti.
2. I micropozzetti del controllo negativo (diluente del campione) devono dare un valore $A_{450} < 0,100$ con i coniugati IgM e IgG quando azzerati (bianco su aria) o un valore $A_{450/630} < 0,050$. I valori negativi $\leq -0,005$ possono indicare un problema con il lettore delle piastre EIA.
3. I micropozzetti del controllo positivo devono essere di colore giallo deciso e rendere un valore A_{450} o $A_{450/630} \geq 0,500$ e $\leq 2,500$ con entrambi i coniugati IgM e IgG.
4. Ad ogni utilizzo i componenti del kit devono essere ispezionati per individuare eventuali segni di contaminazione microbica, congelamento o dispersione. È possibile che nel diluente del campione si formi un precipitato a scaglie che non ne influenzerà le prestazioni.
5. Si consiglia di registrare i risultati di ciascun controllo qualità di ogni seduta in un apposito registro per sorvegliare la qualità delle procedure e garantire la conformità alle norme di qualità.

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 Distributor Locale, (Italia +390331433636).

VALORI ATTESI

I valori previsti per una determinata popolazione devono essere stabiliti per ciascun laboratorio. Il tasso di positività può variare in base alla posizione geografica, al metodo di raccolta dei campioni, alla gestione e al trasporto, al test impiegato e allo stato generale di salute dei pazienti sotto esame.

Il test PREMIER *Coccidioides* EIA ha mostrato tassi di positività del 42,5%, 4,0% e 2,5% in tre diversi studi clinici. La frequenza dell'infezione coccidioidale era superiore nella regione endemica rispetto a quella non endemica.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

1. Il PREMIER *Coccidioides* EIA è inteso per l'utilizzo con campioni di CSF o siero. L'uso di questo test non è consigliato con altro tipo di campioni.
2. Un risultato negativo con IgM e IgG non esclude la diagnosi di coccidioidomicosi, in particolare se è stato testato solo un singolo campione e il paziente mostra sintomi compatibili con una diagnosi positiva.
3. Un risultato positivo con IgM o IgG implica la presenza dell'anticorpo di *C. immitis*. I risultati dell'EIA positivi dovrebbero essere confermati da un dosaggio per immunodiffusione. Tuttavia, a causa dell'insensibilità relativa dei procedimenti ID, un ID negativo non esclude la possibilità di coccidioidomicosi.¹¹ La diagnosi della coccidioidomicosi si basa sui risultati clinici e di laboratorio nonché sulla presenza dell'anticorpo.
4. Anche i risultati positivi con il sole IgM o le sole IgG (non quando entrambi sono positivi) suggeriscono una malattia coccidioidale, ma in diversi stadi della malattia. Un paziente all'inizio della fase acuta può presentare solo una risposta IgM, mentre un paziente cronico o convalescente può presentare solo una risposta IgG. Questi risultati dell'EIA devono essere confrontati con i sintomi del paziente per determinare se esiste una correlazione logica. Poiché in questi casi i risultati IgM e IgG non si confermano a vicenda, è consigliabile un'ulteriore conferma, in particolare se i sintomi non sono correlati al singolo risultato dell'EIA. I risultati positivi con IgM e IgG suggeriscono la presenza di una malattia attiva con un alto livello di attendibilità poiché le analisi si confermano a vicenda.

PRESTAZIONI SPECIFICHE

Il PREMIER *Coccidioides* EIA è stato eseguito in due centri medici di un'area endemica, in un laboratorio di riferimento centrale e da Meridian Bioscience, Inc. su 1315 campioni sottoposti ai test per i coccidioidi, 1242 erano composti da siero e 73 da CSF. Il confronto tra i risultati ottenuti con l'EIA e i metodi di fissazione del complemento sono riportati nella tabella in basso. Quando i risultati dell'EIA e della fissazione del complemento non corrispondevano, i risultati dell'immunodiffusione (ID) e/o della TP sono stati utilizzati per risolvere le discrepanze. I risultati dell'EIA per l'IgM e l'IgG sono presentati sia separatamente che combinati. Per il confronto combinato, un campione è stato considerato positivo se l'IgM, l'IgG o entrambi i risultati erano positivi. I risultati indicano che è possibile ottenere una maggiore sensibilità quando vengono eseguiti i test EIA sia per l'IgM che per l'IgG. Quest'osservazione è compatibile con la nozione secondo cui i pazienti all'inizio della fase acuta possono presentare solo una risposta IgM mentre i pazienti convalescenti o cronici possono presentare solo una risposta IgG.

PREMIER EIA Solo IgM	Fissazione del Complemento		Risolto	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	160	67	189	38
Neg	75	971	65	981
Ind	10	32	12	30

n=1,315

	vs. Fiss. Comp.	vs. Risolto
Sensibilità relativa	68,1%	74,4%
Specificità relativa	93,5%	96,3%
Corrispondenza totale	86,0%	89,0%

Quando le discrepanze tra i risultati IgM dell'EIA e della fissazione del complemento sono state risolte, 29 dei 67 campioni risultati positivi per l'EIA ma negativi per la fissazione del complemento sono stati confermati positivi dai dosaggi ID. Dieci dei 75 campioni negativi per l'EIA e positivi per la fissazione del complemento erano negativi per l'ID.

PREMIER EIA Solo IgG	Fissazione del Complemento		Risolto	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	214	69	248	35
Neg	24	987	22	989
Ind	7	14	8	13

n=1,315

	vs. Fiss. Comp.	vs. Risolto
Sensibilità relativa	89,9%	91,9%
Specificità relativa	93,5%	96,6%
Corrispondenza totale	91,3%	94,1%

Quando le discrepanze tra i risultati IgG dell'EIA e della fissazione del complemento sono state risolte, 34 dei 69 campioni risultati positivi per l'EIA ma negativi per la fissazione del complemento sono stati confermati positivi dai dosaggi ID. Due dei 24 campioni negativi per l'EIA e positivi per la fissazione del complemento erano negativi per l'ID.

PREMIER EIA IgM e IgG	Fissazione del Complemento		Risolto	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Pos	228	99	267	60
Neg	14	934	7	941
Ind	3	37	3	37

n=1,315

	vs. Fiss. Comp.	vs. Risolto
Sensibilità relativa	94,2%	97,4%
Specificità relativa	90,4%	94,0%
Corrispondenza totale	91,1%	94,7%

Quando le discrepanze tra i risultati IgG e IgM dell'EIA e della fissazione del complemento sono state risolte, 39 dei 99 campioni risultati positivi per l'EIA ma negativi per la fissazione del complemento sono stati confermati positivi dai dosaggi ID. Sette dei 14 campioni negativi per l'EIA e positivi per la fissazione del complemento erano negativi per l'ID. In un luogo dell'aria endemica tre pazienti sono risultati positivi per l'EIA, mentre risultavano tutti negativi per i classici metodi serologici. Un nuovo test di un campione successivo di 2-14 giorni dopo, ha confermato che questi pazienti avevano una malattia acuta e l'EIA aveva correttamente dimostrato la presenza di anticorpi a uno stadio precedente rispetto ai metodi classici.

RIPRODUCIBILITÀ

Variabilità intra-dosaggio – Dodici repliche di tre diversi sieri positivi sono stati testati per IgM e IgG in un unico dosaggio per determinare la riproducibilità intra-dosaggio. Le 12 repliche di ciascun campione sono state eseguite utilizzando una sola diluizione alla percentuale di 1:441.

Variabilità intra-dosaggio			
Campione	Ass. IgM medio	D.C.	% C.V.
1	0,478	0,026	5,4
2	0,477	0,033	6,9
3	0,928	0,045	4,8
Campione	Ass. IgG medio	D.C.	% C.V.
1	2,179	0,072	3,3
4	1,132	0,069	6,1
5	0,511	0,048	9,4

Variabilità inter-dosaggio – Tre campioni positivi sono stati testati per IgM e IgG in più dosaggi eseguiti da due o più operatori. Ciascun operatore ha eseguito le diluizioni alla percentuale di 1:441, quindi il protocollo del dosaggio. Ciascun test era composto da tre copie di ciascun campione testate da un solo operatore.

Variabilità inter-dosaggio			
Campione	Ass. IgM medio	D.C.	% C.V.
6	0,532	0,033	6,1
7	0,562	0,064	11,4
8	1,020	0,071	7,0
Campione	Ass. IgG medio	D.C.	% C.V.
6	2,082	0,170	8,2
9	1,147	0,080	7,0
10	0,520	0,069	13,4

CROSS-REATTIVITÀ

Numerosi rapporti hanno indicato un importante problema di reazione crociata con la fissazione del complemento, il lattice e altri dosaggi EIA per gli anticorpi coccidioidi, ^{1,4} pazienti che soffrono di altre malattie fungine come l'istoplasmosi, la blastomicosi e l'aspergillosi. I dati di seguito riportati dimostrano che quando i campioni contenenti fattori reumatoidi, anticorpi antinucleari o antigeni del criptococco sono stati testati con PREMIER *Coccidioides*, la specificità complessiva era del 95,7%.

	IgM medio	IgG medio	Pos./Totale	Specificità
<i>Histoplasma</i>	0,043	0,041	4/79	95%
<i>Blastomyces</i>	0,026	0,025	0/9	100%
<i>Aspergillus</i>	0,062	0,039	2/20	90%
Fattore remautoide	0,060	0,015	0/10	100%
Ass. antinucleari	0,026	0,010	0/7	100%
<i>Mycoplasma</i>	0,026	0,008	0/11	100%
<i>Cryptococcus</i>	0,007	0,008	0/8	100%
Influenza	0,016	0,009	0/5	100%
HIV	0,008	0,031	1/15	93%

FRANÇAIS

PREMIER® COCCIDIOIDES

Test immuno-enzymatique pour la détection qualitative des anticorps IgM et IgG dirigés contre les antigènes TP et CF de *Coccidioides immitis* dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (CSF)

REF 603096

IVD

Rx Only

BUT DE LA METHODE

Le dosage immuno-enzymatique (EIA) PREMIER *Coccidioides* de Meridian est destiné à la détection qualitative des anticorps IgM et IgG dirigés contre les antigènes TP et CF de *Coccidioides immitis* dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (CSF). La confirmation des résultats EIA positifs par la méthode d'immunodiffusion est recommandée.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

C. immitis est l'un des agents pathogènes de mycoses profondes. Cette maladie est surtout localisée dans le sud-ouest des Etats-Unis et au Mexique, mais l'extension des voyages augmente les risques d'infection dans les régions non endémiques.^{1,2}

L'infection présente un défi diagnostique aussi bien pour les médecins que pour les biologistes. Les lésions provoquées par *C. immitis* ne permettent pas de déterminer l'agent fongique pathogène ou de distinguer ces lésions de lésions tuberculeuses, et de néoplasmes (bénins ou malins). Les symptômes ne sont pas spécifiques à la maladie et peuvent ressembler aux symptômes associés à diverses pneumonies, sarcoïdoses, cancers et autres maladies.^{1,2} Les organismes sont difficiles à démontrer, aussi bien en culture qu'en histologie, et ce même après plusieurs tentatives.^{1,2}

Le recours à la sérologie est souvent le seul moyen d'établir un diagnostic préliminaire, puis de guider le choix de techniques diagnostiques plus définitives, telles que la culture ou la biopsie. La fixation du complément, la technique d'immunodiffusion (ID) et l'agglutination au latex constituent les trois principales méthodes sérologiques.¹ L'antigène TP de précipitine en tube est constitué de 120 kDa de glycoprotéine avec déterminants d'hydrate de carbone.^{3,4} Les anticorps de l'antigène TP sont détectés soit par le dosage de précipitine en tube, soit par un système d'immunodiffusion.⁵⁻⁸ La présence d'anticorps dirigés contre l'antigène TP est interprétée comme l'indication d'une mycose profonde, et correspond essentiellement à une production d'anticorps de la classe IgM. L'antigène de fixation du complément (CF) est une protéine thermolabile. Dans les phases tardives de la maladie, les anticorps dirigés contre l'antigène CF sont détectés par les systèmes d'immunodiffusion ou de fixation du complément.^{1,2,7,9} La méthode de fixation du complément permet de quantifier la production d'anticorps de la classe IgG et de guider la thérapie.^{1,2,7} L'agglutination au latex constitue une méthode de dépistage négative, sensible et rapide, qui exige toutefois confirmation par une autre méthode. Aucun système de dosage disponible dans le commerce ne permettait jusqu'à présent de dépister les réactions IgM et IgG aux antigènes TP et CF.

Le dosage immuno-enzymatique (EIA) PREMIER *Coccidioides* constitue un test rapide de détection des anticorps de la classe IgM et IgG contre les antigènes coccidioides TP et CF. Lorsque cette méthode est combinée à d'autres tests de laboratoire et aux résultats de l'examen clinique, elle constitue un bon outil d'aide au diagnostic d'infections dues à *C. immitis*.

PRINCIPE DU TEST

Le dosage immuno-enzymatique (EIA) PREMIER *Coccidioides* utilise un mélange d'antigènes TP et CF purifiés fixés dans les micropuits afin de capturer les anticorps IgM et IgG correspondants. Les échantillons dilués sont ajoutés dans deux micropuits distincts. Les anticorps des antigènes coccidioidaux se lient aux antigènes fixés. Après lavage des constituants non fixés, un conjugué enzymatique anti-IgM est placé dans un micropuit et un conjugué enzymatique anti-IgG est placé dans l'autre. Si les anticorps du patient se lient, un sandwich se forme entre les antigènes fixés, les anticorps du patient et l'un des conjugués ou les deux. Après lavage et extraction du conjugué non fixé, on ajoute un substrat, qui développe une coloration en présence du conjugué enzymatique lié.

MATERIEL FOURNI

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

- PREMIER *Coccidioides* Micropuits recouverts d'antigène – Micropuits en plastique sécables, recouverts d'un mélange d'antigènes TP et CF.
- PREMIER *Coccidioides* Contrôle positif – Sérum humain positif pré-dilué contenant de l'azide de sodium (0,10 %) comme conservateur. Ne pas diluer plus.
- PREMIER *Coccidioides* Diluant pour échantillon – Solution de protéines tamponnée contenant de l'azide de sodium (0,10 %) comme conservateur.
- Tampon de lavage 20X (PREMIER 20X Wash Buffer II) – Tampon de lavage concentré contenant du thimérosal (0,2 %) comme conservateur.
- PREMIER *Coccidioides* Conjugué enzymatique IgM – Anticorps de chèvre anti-IgM humaines purifiés, conjugués à la peroxydase de raifort dans une solution de protéines tamponnée contenant du thimérosal (0,02 %) comme conservateur.
- PREMIER *Coccidioides* Conjugué enzymatique IgG – Anticorps de chèvre anti-IgG humaines purifiés, conjugués à la peroxydase de raifort dans une solution de protéines tamponnée contenant du thimérosal (0,02 %) comme conservateur.
- Substrat (PREMIER Substrate I) – Solution tamponnée contenant du peroxyde et du tétraméthylbenzidine.
- Solution d'arrêt (PREMIER Stop Solution I) – Acide phosphorique 1 M. ATTENTION: Eviter tout contact avec la peau. En cas de contact, rincer immédiatement avec de l'eau.
- Support de plaque

MATERIEL NON FOURNI

- Pipettes de 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL et 200 µL
- Tubes à essai (12 x 75 mm) pour diluer les échantillons
- Eau distillée ou désionisée
- Lecteur de plaque EIA avec filtre à 450 nm. Un lecteur de longueur d'onde double équipé d'un second filtre de 630 nm est recommandé
- Flacon de lavage ou laveur automatique de plaque EIA
- Minuteur
- Epruvette graduée destinée à préparer le Tampon de Lavage 1X

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Tous les réactifs sont pour un usage diagnostique in vitro.
- La concentration des réactifs, les temps d'incubation et les températures indiqués fournissent une sensibilité et une spécificité optimales. Il est recommandé d'adhérer à ces spécifications pour obtenir les meilleurs résultats.
- Les échantillons des patients et les sérums de contrôle peuvent contenir des agents infectieux. Le sérum de contrôle positif contient du sérum humain ayant subi un dépistage négatif pour HBsAg et les anticorps au VIH-1. Aucun test ne peut toutefois apporter l'assurance formelle de la non transmission du VIH, du virus des hépatites ou d'autres agents infectieux par le sang humain. En conséquence, les échantillons des patients, les sérums de contrôle et tout le matériel entrant en contact avec ces éléments doivent être manipulés au niveau de biosécurité 2 tel qu'il est recommandé dans le manuel CDC/NIH « Biosafety in Microbiology in Biomedical Laboratories » (Biosécurité microbiologique dans les laboratoires biomédicaux). Laisser les réactifs atteindre la température ambiante et bien mélanger avant usage.
- Ne pas interchanger les micropuits, le conjugué enzymatique IgM, le conjugué enzymatique IgG ou le contrôle positif provenant de lots de coffrets différents. Le diluant pour échantillon, la solution de lavage concentrée 20X (PREMIER 20X Wash Buffer II) le substrat (PREMIER Substrate I) et la solution d'arrêt (PREMIER Stop Solution I) sont interchangeables lorsque ces réactifs n'ont pas dépassé leur date d'expiration respective au moment du dosage.
- Maintenir les flacons de réactifs en position verticale afin d'obtenir un écoulement et un volume de gouttes adéquats.
- Remplacer les bouchons de couleur sur les flacons correspondants.
- Eviter tout contact avec la peau de la solution d'arrêt (PREMIER Stop Solution I) (Acide phosphorique 1 M). En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau.
- Pour éviter tout débordement lors du dépôt des échantillons dilués dans les puits, placer le bout de la pipette à mi-hauteur de puits et déposer très lentement l'échantillon dilué, le long de la paroi du puits.
- Le lavage de la microplaque doit être exécuté strictement selon les instructions. Un lavage incorrect peut entraîner un bruit de fond élevé dans tout protocole EIA.
- Ne pas utiliser les micropuits dont le sachet de conservation est endommagé (ie. ouvertures ou trous).
- Ne pas utiliser les micropuits si l'indicateur du dessiccateur a viré du bleu au rose.

DANGER ET MISES EN GARDE

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

DUREE DE CONSERVATION ET STOCKAGE

La date d'expiration figure sur l'étiquette du coffret. Stocker le coffret entre 2 et 8 C et le replacer rapidement au réfrigérateur après chaque utilisation. Les micropuits inutilisés doivent être retirés de la plaque et placés dans la pochette en aluminium refermable. Refermer immédiatement la pochette après chaque ouverture afin de protéger les barrettes de l'humidité.

PREPARATION DES REACTIFS

Porter l'ensemble du coffret, pochette comprise, à une température comprise entre 22 et 25 C avant utilisation et conserver cette température pendant la manipulation. **Le réchauffement exige une heure minimum.** Préparer suffisamment de tampon de lavage 1X: en diluant une part de tampon de lavage concentré (PREMIER 20X Wash Buffer II) dans 19 parts d'eau purifiée. Le tampon de lavage 1X peut être conservé un mois maximum à 22-25 C. Eliminer tout tampon de lavage 1X contaminé. Pour effectuer le lavage, le tampon 1X peut être transvasé dans un flacon laveur ou un flacon en plastique déformable. Il est également possible de recourir à un laveur de microplaque automatique. **REMARQUE:** Les laveurs de plaque automatiques tendent à gaspiller le tampon et risquent d'épuiser prématurément le Tampon de Lavage concentré (PREMIER 20X Wash Buffer II). Le cas échéant, contacter Meridian pour passer commande de flacon de tampon concentré (PREMIER 20X Wash Buffer II) supplémentaire.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le sérum obtenu à partir de sang coagulé ou le liquide céphalo-rachidien (CSF) peut être testé à l'aide des réactifs du coffret. Les échantillons inactivés à 56 C (pendant 30 minutes) sont également acceptables. Ne pas utiliser de CSF contenant du sang. Les échantillons doivent être testés le plus rapidement possible, mais peuvent être conservés cinq jours au maximum entre 2 et 8 C. Si le test doit être différé plus longtemps, il est préférable de subdiviser l'échantillon et de congeler (-20 à -80 C) les aliquotes pour éviter les cycles de congélation-décongélation répétés. Ne pas stocker dans un congélateur dégivrant.

Diluer le sérum et le CSF avec le diluant pour échantillon tel qu'indiqué ci-dessous. Toute autre méthode de dilution risquerait d'épuiser prématurément le volume du diluant pour échantillon.

Sérum

- Diluer le sérum à 1:441 avec le diluant pour échantillon comme suit:
- Préparer deux tubes à essai par échantillon de sérum. Transférer 200 µL de diluant pour échantillon dans le PREMIER tube et 400 µL dans le second.
 - Transférer 10 µL de sérum dans le PREMIER tube et bien mélanger.
 - Transférer 20 µL de la première dilution dans le second tube et bien mélanger.

Liquide céphalo-rachidien (CSF)

- Diluer le CSF à 1:21 avec le diluant pour échantillon comme suit:
- Préparer un tube à essai par échantillon de CSF et transférer 400 µL de diluant pour échantillon dans chaque tube.
 - Transférer 20 µL de CSF dans le tube de dilution et bien mélanger.

PROCEDURE DE TEST

REMARQUE: Chaque micropuits est recouvert d'antigènes TP et CF. Il est recommandé de doser simultanément les anticorps IgM et IgG dans tous les sérums.

- Détacher le nombre nécessaire de micropuits pour les échantillons et les sérums de contrôle et les placer sur la microplaque. Etablir un plan de distribution des contrôles et des échantillons, comme indiqué dans l'exemple ci-dessous. **L'étape 3 décrite ci-dessous doit être effectuée en 6 minutes au maximum** ; il convient, le cas échéant, de réduire le nombre d'échantillons pour ne pas dépasser ce délai.

	1	2	3	4	5	6	
A	CP	DE	Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Pt. 4	IgM
B	CP	DE	Pt. 1	Pt. 2	Pt. 3	Pt. 4	IgG

- Ajouter en double (A1 et B1) 100µL de contrôle positif (CP) et 100 µL de diluant pour échantillon (DE) dans 2 micropuits séparés (dans A2 et B2). **Ces derniers sont considérés comme contrôles négatifs.**
- Ajouter en double 100 µL de chaque échantillon (dilué tel qu'indiqué à la section Préparation des échantillons) dans 2 micropuits séparés, dans les rangées A et B, comme dans le schéma ci-dessus. Eviter toute contamination croisée entre les échantillons, ce qui entraînerait des résultats erronés. Mélanger en agitant soigneusement la microplaque 10 à 15 secondes sur la surface de travail.
- Laisser incuber 30 minutes entre 22 et 25 C.
- Tenir la plaque fermement par le fond et la comprimer délicatement.
 - Vider le contenu de la microplaque dans un récipient pour déchets biologiques et taper fermement la plaque retournée sur une pile de serviettes en papier ou sur toute autre matière absorbante.
 - Laver les puits à l'aide du tampon de lavage 1X en veillant à diriger le jet sur la paroi des puits pour éviter la formation de mousse. Vider le contenu de la plaque dans un conteneur de déchets et taper fermement la microplaque retournée sur une pile de papier absorbant.
 - Répéter 2 fois l'étape 5b afin d'effectuer un total de 3 lavages. Après la dernière étape, taper fermement la plaque retournée sur du papier absorbant propre afin d'éliminer au mieux les traces résiduelles de tampon de lavage. Ne jamais laisser sécher les puits.
- Déposer 2 gouttes de conjugué enzymatique IgM dans les micropuits de la rangée A, ou selon les besoins en fonction du nombre d'échantillons.
- Déposer 2 gouttes de conjugué enzymatique IgG dans les micropuits de la rangée B, ou selon les besoins en fonction du nombre d'échantillons. Mélanger en agitant soigneusement la microplaque 10 à 15 secondes sur la surface de travail.
- Laisser incuber 30 minutes entre 22 et 25 C.
- Eliminer les conjugués enzymatiques de chaque micropuits et laver 3 fois comme indiqué à l'étape 5.
- Déposer 2 gouttes de Substrat (PREMIER Substrate I) dans chaque micropuits. Régler le minuteur dès l'addition du substrat dans le PREMIER puits. Mélanger en agitant soigneusement la microplaque 10 à 15 secondes sur la surface de travail.
- Laisser incuber 5 minutes entre 22 et 25 C.
- Déposer 2 gouttes de solution d'arrêt (PREMIER Stop Solution I) dans chaque micropuits, dans le même ordre que les additions de substrat (étape 10). Mélanger en agitant soigneusement la microplaque 10 à 15 secondes sur la surface de travail, puis attendre 2 minutes avant de procéder à la lecture, qui doit être réalisée dans le quart d'heure qui suit.
- Essuyer soigneusement le dessous des micropuits avec un linge non pelucheux et mesurer l'absorbance.
 - On recommande l'emploi d'un lecteur de longueur d'onde double équipé de filtres de 450 nm et 630 nm. **REALISER UN CONTRÔLE TEMOIN A L'AIR.**
 - Dans les cas où une seule longueur d'onde est utilisée, mesurer l'absorbance à 450 nm comme suit:
 - Réaliser un contrôle témoin à l'air.
 - Lire le(s) micropuits de contrôle négatif; les valeurs doivent être inférieures à 0,100.
 - Réaliser à nouveau un contrôle témoin du lecteur sur le (les) puits de contrôle négatif pour compenser le bruit de fond.
- Désinfecter et conserver le support de plaque. Eliminer tous les échantillons et le matériel de dosage dans des conteneurs de déchets biologiques.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Résultats

Négatif = Valeur d'absorbance < 0,150

Indéterminé = Valeur d'absorbance comprise entre $\geq 0,150$ et $\leq 0,199$

Positif = Valeur d'absorbance supérieure ou égale à 0,200

Un résultat négatif pour IgM et IgG indique soit l'absence d'anticorps contre *C. immitis*, soit un nombre d'anticorps inférieur au niveau de détection du test, soit encore un échantillon obtenu trop tôt. Un résultat positif pour IgM ou IgG indique la présence d'anticorps contre *C. immitis*, et doit être signalé. Les patients en phase précoce aiguë peuvent ne présenter qu'une réponse IgM, tandis que les patients chroniques ou convalescents peuvent ne présenter qu'une réponse IgG. Les échantillons qui ne sont ni positifs ni négatifs sont considérés indéterminés. Ces échantillons doivent être retestés, et les résultats consignés. Obtenir un second échantillon si le résultat demeure indéterminé.

Les réactions positives prononcées peuvent produire un précipité pour quelques minutes après l'arrêt de la réaction. Les valeurs d'absorbance obtenues avec de telles réactions peuvent être inférieures à la normale, mais elles n'en sont pas moins positives.

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.

- Les contrôles positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque série de test pour déterminer la validité des résultats.

- Les puits de contrôle négatif (diluants pour échantillon) doivent produire une valeur $A_{450} < 0,100$ avec les conjugués IgM et IgG quand ils sont lus comme contrôle témoin à l'air ou d'une valeur $A_{450/630} < 0,050$. Les valeurs négatives inférieures ou égales à $-0,005$ peuvent indiquer un dysfonctionnement du lecteur de plaque EIA.
- Les micropuits de contrôle positif doivent présenter une couleur jaune distincte et produire une valeur A_{450} ou $A_{450/630} \geq 0,500$ et $\leq 2,500$ avec les conjugués IgM et IgG.
- Lors de chaque utilisation, les composants du coffret doivent être visuellement examinés afin de déterminer tout signe évident de contamination microbienne, congélation ou fuite. Un précipité floconneux se formant dans le diluant pour échantillon n'a aucune incidence sur les performances.
- Les résultats des contrôles obtenus doivent être consignés dans un journal réservé à cet effet, conformément à la réglementation en vigueur ; de plus, ces dispositions préservent la haute qualité des tests.

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

VALEURS ATTENDUES

Les valeurs escomptées pour une population donnée doivent être déterminées par chaque laboratoire. Les performances du test peuvent être affectées par le lieu géographique, les méthodes de recueil, de manutention et de transport des échantillons, le test employé et l'état de santé général de la population étudiée.

Le test immuno-enzymatique (EIA) PREMIER *Coccidioides* a démontré une proportion totale de positivité de 42,5%, 4,0% et 2,5% dans trois études cliniques distinctes. La fréquence des infections coccidioidales était plus élevée dans les régions endémiques que dans les régions non endémiques.

LIMITES DU TEST

- Le test immuno-enzymatique (EIA) PREMIER *Coccidioides* est destiné à être utilisé avec des échantillons de sérum ou de CSF. L'emploi de tout autre échantillon est déconseillé.
- Un résultat négatif avec IgM et IgG n'exclut pas la possibilité d'une coccidioidomycose, surtout si un seul échantillon a été testé et si le patient présente les symptômes d'un diagnostic positif.
- Un résultat positif avec IgM ou IgG signifie la présence d'anticorps contre *C. immitis*. Les résultats EIA positifs doivent être confirmés par la méthode d'immunodiffusion. Un résultat ID négatif n'écarte toutefois pas la possibilité d'une coccidioidomycose en raison de la relative insensibilité des procédures ID.¹¹ Un diagnostic de coccidioidomycose est basé sur les tests de laboratoire, le profil clinique du patient et la présence d'anticorps.
- Un résultat positif avec soit IgM soit IgG suggère également une infection coccidioidale, le stade d'infection étant différent. Les patients en phase précoce aiguë peuvent ne présenter qu'une réponse IgM, tandis que les patients chroniques ou convalescents peuvent ne présenter qu'une réponse IgG. Les résultats obtenus doivent être mis en corrélation avec les symptômes du patient. Lorsque les résultats IgM et IgG ne sont pas identiques, une confirmation par une autre méthode est conseillée, en particulier si les symptômes ne correspondent pas au résultat du dosage EIA. Des résultats positifs avec IgM et IgG suggèrent très vraisemblablement une infection active.

PERFORMANCES DU TEST

Le test immuno-enzymatique (EIA) PREMIER *Coccidioides* a été évalué dans deux centres médicaux situés dans une région endémique, un laboratoire central de référence et Meridian Bioscience, Inc. Un total de 1315 échantillons ont été testés pour *Coccidioides*, 1242 à partir de sérum et 73 à partir de CSF. Les tableaux qui suivent présentent la comparaison des résultats obtenus avec la méthode EIA et la méthode de fixation du complément. Lorsque les résultats de ces deux méthodes ne concordent pas, les résultats de la méthode d'immunodiffusion (ID) et/ou du dosage de précipité en tube (TP) ont permis de résoudre la non concordance. Les résultats EIA pour IgM et IgG sont présentés séparément et ensemble. Pour la comparaison combinée, un échantillon a été considéré positif en cas de réaction à IgM ou IgG, ou les deux. Les résultats indiquent que l'on obtient une plus grande sensibilité lorsque les tests EIA pour IgM et IgG sont réalisés. Cette observation est cohérente avec le fait que les patients en phase précoce aiguë peuvent ne présenter qu'une réponse IgM, tandis que les patients chroniques ou convalescents peuvent ne présenter qu'une réponse IgG.

EIA Pour IgM Uniquement	Fixation du Complément		Résolution	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positif	160	67	189	38
Négatif	75	971	65	981
Equivoque	10	32	12	30

n=1315

	comparé à la fixation du comp.	comparé à la résolution
Sensibilité relative	68,1%	74,4%
Spécificité relative	93,5%	96,3%
Concordance globale	86,0%	89,0%

Une fois les discordances entre les résultats du dosage EIA pour IgM et ceux du test de fixation du complément résolues, 29 des 67 échantillons qui étaient positifs par le dosage EIA, mais négatifs par la fixation du complément, ont été confirmés comme étant positifs par la méthode ID. Dix des 75 échantillons qui étaient négatifs par le dosage EIA, mais positifs par la fixation du complément ont été confirmés comme étant négatifs par la méthode ID.

EIA Pour IgG Uniquement	Fixation du Complément		Résolution	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positif	214	69	248	35
Négatif	24	987	22	989
Equivoque	7	14	8	13

n=1315

	comparé à la fixation du comp.	comparé à la résolution
Sensibilité relative	89,9%	91,9%
Spécificité relative	93,5%	96,6%
Concordance globale	91,3%	94,1%

Une fois les discordances entre les résultats du dosage EIA pour IgG et ceux du test de fixation du complément résolues, 34 des 69 échantillons qui étaient positifs par le dosage EIA, mais négatifs par la fixation du complément, ont été confirmés comme étant positifs par la méthode ID. Deux des 24 échantillons qui étaient négatifs par le dosage EIA, mais positifs par la fixation du complément ont été confirmés comme étant négatifs par la méthode ID.

EIA Pour IgM et IgG Uniquement	Fixation du Complément		Résolution	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positif	228	99	267	60
Négatif	14	934	7	941
Equivoque	3	37	3	37

n=1315

	comparé à la fixation du comp.	comparé à la résolution
Sensibilité relative	94,2%	97,4%
Spécificité relative	90,4%	94,0%
Concordance globale	91,1%	94,7%

Une fois les discordances entre les résultats du dosage EIA pour IgM et IgG et ceux du test de fixation du complément résolues, 39 des 99 échantillons qui étaient positifs par le dosage EIA, mais négatifs par la fixation du complément, ont été confirmés comme étant positifs par la méthode ID. Sept des 14 échantillons qui étaient négatifs par le dosage EIA, mais positifs par la fixation du complément ont été confirmés comme étant négatifs par la méthode ID.

Sur un des sites dans la région endémique, trois patients pour lesquels le dosage EIA a déterminé un résultat positif, étaient négatifs avec toutes les autres méthodes sérologiques classiques. Le renouvellement du test sur un nouvel échantillon prélevé 2 à 14 jours plus tard a confirmé une infection aiguë chez ces patients; le dosage EIA a donc correctement démontré des anticorps avant les méthodes classiques.

REPRODUCTIBILITE DU TEST

Variation intra-dosages – La reproductibilité intra-dosages a été étudiée en laboratoire sur douze réplicats de Trois sérums positifs connus distincts pour IgM et IgG. Les 12 réplicats de chaque échantillon ont été réalisées avec une dilution de 1:441.

Variation intra essais			
Echantillon	Abs. IgM moyenne	DE	% C.V.
1	0,478	0,026	5,4
2	0,477	0,033	6,9
3	0,928	0,045	4,8

Variation intra essais			
Echantillon	Abs. IgG moyenne	DE	% C.V.
1	2,179	0,072	3,3
4	1,132	0,069	6,1
5	0,511	0,048	9,4

Variation inter-dosages – L'étude de reproductibilité inter-dosages a été effectuée par deux ou plus technologues de laboratoire. Chaque technologue de laboratoire a évalué trois échantillons positifs connus pour IgM et IgG plusieurs fois, dilués au 1:441, puis suivi le protocole. Chaque échantillon a été testé en triple par un seul technologue de laboratoire.

Variation inter essais			
Echantillon	Abs. IgM moyenne	DE	% C.V.
6	0,532	0,033	6,1
7	0,562	0,064	11,4
8	1,020	0,071	7,0

Variation inter essais			
Echantillon	Abs. IgG moyenne	DE	% C.V.
6	2,082	0,170	8,2
9	1,147	0,080	7,0
10	0,520	0,069	13,4

REACTIONS CROISEES

De nombreux rapports signalent des problèmes de réaction croisée avec les méthodes de fixation du complément, au latex et d'autres méthodes EIA pour anticorps coccidioidaux,^{1,4} notamment lorsque les patients souffrent d'autres infections fongiques telles que Histoplasmosis, Blastomycosis et Aspergilliosis. Le tableau ci-dessous indique que lorsque des échantillons sérologiques positifs pour des anticorps contre divers organismes, et des échantillons contenant un facteur rhumatoïde, des anticorps antinucléaires ou des antigènes cryptococaux étaient testés avec le dosage immunoenzymatique (EIA) PREMIER *Coccidioides*, la spécificité était de 95,7%.

	IgM moyenne	IgG moyenne	Pos./Total	Spécificité
<i>Histoplasma</i>	0,043	0,041	4/79	95%
<i>Blastomyces</i>	0,026	0,025	0/9	100%
<i>Aspergillus</i>	0,062	0,039	2/20	90%
Facteur rhumatoïde	0,060	0,015	0/10	100%
Abs antinucléaire	0,026	0,010	0/7	100%
<i>Mycoplasma</i>	0,026	0,008	0/11	100%
<i>Cryptococcus</i>	0,007	0,008	0/8	100%
Influenza	0,016	0,009	0/5	100%
VIH	0,008	0,031	1/15	93%

ESPAÑOL

PREMIER® COCCIDIOIDES

Prueba de Inmunoensayo Para la Detección de Anticuerpos IgG y IgM Dirigidos Contra los Antígenos TP y CF de *Coccidioides immitis* en Suero y Líquido Cefalorraquídeo (LCR)

REF 603096

IVD

Rx Only

USO INDICADO

El inmunoensayo enzimático PREMIER *Coccidioides* EIA es utilizado para la detección cualitativa de los anticuerpos IgM y IgG contra los antígenos TP y CF del *Coccidioides immitis* en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR). Es recomendable que los resultados positivos del test EIA sean corroborados por ensayo de inmunodifusión.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

C. immitis es un agente causal importante de micosis profundas. Di bien el moho *C. immitis* es endémico en la zona sudoeste de los Estados Unidos y en México, el aumento del turismo a estas zonas también ha resultado en una incidencia más frecuente de micosis causadas por este moho en las zonas no endémicas.^{1,2}

La coccidioidomicosis presenta un reto para el diagnóstico al médico y al técnico de laboratorio. Las lesiones producidas por *C. immitis* pueden ser difíciles de diferenciar de otras enfermedades micóticas o de lesiones tuberculosas y neoplasmas (benignos y malignos). Con frecuencia, los síntomas son indiferenciables y pueden asemejarse a los de varios tipos de neumonías, sarcoidosis, cánceres y otras enfermedades.^{1,2} La detección de los organismos mediante cultivos y estudios histológicos, aún después de intentos repetidos, puede ser difícil.^{1,2}

Con frecuencia, las serologías ofrecen la única vía disponible para formular un diagnóstico preliminar. Los resultados de serologías pueden sugerir el uso de otras técnicas más definitivas, tales como cultivos o biopsias. Los métodos de fijación de complemento, inmunodifusión (ID) y aglutinación con látex son las técnicas serológicas principales.¹ El antígeno TP (precipitina en tubo) es una glicoproteína de 120 kDa con determinantes compuestos por carbohidratos.^{3,4} Los anticuerpos contra el antígeno TP pueden ser detectados tanto por el ensayo de precipitina en tubo o un sistema de inmunodifusión.⁵⁻⁸ La presencia de anticuerpos contra el antígeno TP es interpretada como evidencia de enfermedad coccidioides aguda y la respuesta principal es IgM. El antígeno en el test de fijación de complemento (CF) es una proteína lábil al calor. Los anticuerpos contra el antígeno CF pueden ser detectados por técnicas de inmunodifusión o de fijación de complemento durante las etapas más avanzadas de la enfermedad.^{1,2,7,9} El test de fijación de complemento se utiliza para cuantificar la respuesta de IgG y controlar la terapia.^{1,2,7} Los ensayos por aglutinación con látex ofrecen un método de determinación negativo sensible y rápido, pero carecen de la especificidad requerida para obviar confirmación. No existe ningún sistema de ensayos producido comercialmente con la capacidad para determinar las respuestas tanto de IgM como de IgG, a los dos antígenos TP y CF.

El Inmunoensayo enzimático PREMIER *Coccidioides* EIA es un test rápido para la detección de anticuerpos IgM y IgG contra los antígenos *coccidioides* TP y CF. Cuando es utilizado conjuntamente con otros datos clínicos y de laboratorio, este inmunoensayo constituye una herramienta útil para el diagnóstico de infecciones causadas por *C. immitis*.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El Inmunoensayo enzimático PREMIER *Coccidioides* EIA utiliza una mezcla de antígenos TP y CF purificados y adsorbidos a micropocillos para capturar los anticuerpos IgM y IgG correspondientes. En cada uno de un par de pocillos duplicados, se agrega la muestra diluida. Los anticuerpos contra los antígenos de coccidioides, si están presentes, se ligan a los antígenos adsorbidos. Después de lavar los pocillos para eliminar los componentes no ligados de la muestra, se agrega a un micropocillo un conjugado de enzima anti-IgM, y al otro pocillo, un conjugado de enzima anti-IgG. Si los anticuerpos de la muestra del paciente se ligan, la reacción forma un "sandwich" entre los antígenos adsorbidos, los anticuerpos del paciente y uno o ambos conjugados. Después de lavar los micropocillos para eliminar el conjugado no ligado, se agrega una solución de sustrato. En presencia de los conjugados de enzima ligados se desarrolla color en los micropocillos.

REACTIVOS/MATERIALES PROPORCIONADOS

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

- PREMIER *Coccidioides* Micropocillos recubiertos con antígeno** – micropocillos desprendibles de plástico, recubiertos con una mezcla de los antígenos TP y CF.
- PREMIER *Coccidioides* Control Positivo** – suero humano positivo prediluido con Azida Sodica (0.10%) como agente preservante. No debe diluirse nuevamente.
- PREMIER *Coccidioides* Diluyente de Muestras** – solución proteica tamponada con Azida Sodica (0.10%) como agente preservante.
- PREMIER Solución Tampón de Lavado 20X II** – Solución tampón de lavado, concentrada con timerosal (0.2%) como agente preservante.
- PREMIER *Coccidioides* Conjugado Enzimático IgM** – anticuerpos anti-IgM humano de cabra, purificados mediante cromatografía por afinidad, conjugados con peroxidasa de rábano en una solución proteica tamponada con timerosal (0.02%) como agente preservante.
- PREMIER *Coccidioides* Conjugado Enzimático IgG** – anticuerpos anti-IgG humano, de cabra, purificados mediante cromatografía por afinidad, conjugados con peroxidasa de rábano en una solución proteica tamponada con timerosal (0.02%) como agente preservante.
- PREMIER Substrato I** – solución tamponada con peróxido y tetrametil benzidina.
- PREMIER Solución de Parada I** – 1 M Ácido Fosfórico. **PRECAUCIÓN:** evite el contacto con la piel. Si ocurre contacto, lave con un chorro de agua.
- Soporte para tiras de micropocillos**

MATERIALES NO PROPORCIONADOS

- Pipetas con capacidad para dispensar 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL y 200 µL
- Tubos de ensayo (12 x 75 mm) para diluir las muestras
- Agua destilada o desionizada
- Espectrofotómetro para platos de ELISA (EIA) con capacidad de lectura a 450 nm. Es recomendable usar un espectrofotómetro de doble haz, con un filtro secundario de 630 nm para corregir la dispersión de la luz
- Frasco atomizador o dispositivo automático para dispensar la solución de lavado de placas (EIA)
- Cronómetro
- Cilindro graduado para diluir la Solución de Lavado a 1X

PRECAUCIONES

- Todos los reactivos son sólo para uso diagnóstico in vitro.
- La concentración de los reactivos, el tiempo de incubación y la temperatura han sido optimizados para proporcionar máxima sensibilidad y especificidad. Para obtener los mejores resultados deben seguirse las especificaciones.
- Las muestras de pacientes y el Control Positivo pueden contener agentes infecciosos. El Control Positivo contiene sueros humanos que fueron analizados para determinar la presencia del antígeno australiano (HBsAg) y el anticuerpo contra VIH-1 con resultados negativos. No obstante, no existe método alguno que pueda garantizar la ausencia del VIH en la sangre humana, y que ésta no transmitirá el VIH, el virus de la hepatitis u otros agentes infecciosos. Las muestras de pacientes, el Control Positivo y todos los materiales que tengan contacto con estos elementos deben manipularse siguiendo las pautas de Bioseguridad Nivel 2 recomendadas en el manual "*Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories*" (Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Biomédica), del CDC/NIH.
- Todos los reactivos deben mezclarse suavemente y estar a temperatura ambiente antes de usarlos.
- No intercambiar micropocillos, Conjugado IgM, Conjugado IgG o Control Positivo entre diferentes kits. Los siguientes reactivos son intercambiables, provisto que estén dentro de su fecha de expiración cuando se usen; Tampón de lavado 20X II, Diluyente de Muestra, Substrato I, y Solución de Parada I.
- Aguarde los viales de reactivos en forma vertical para asegurar que dispensa las gotas del tamaño apropiado.
- Vuelva a tapar los viales con los tapones de color correspondientes.
- Evite el contacto de la Solución de Parada I (1 M Ácido Fosfórico) con la piel. Si ocurre contacto, lave inmediatamente con abundante agua.
- Evite salpicar cuando dispense la muestra diluida en los pocillos. Para evitar salpicaduras, baje la punta de la pipeta aproximadamente a la mitad del pocillo y dispense la muestra diluida contra la pared del pocillo.
- Es importante lavar los pocillos exactamente como se indica en el procedimiento del test. **El lavado inadecuado puede causar valores elevados de color de fondo en cualquier protocolo de inmunoensayos enzimáticos (EIA).**
- No use micropocillos que tengan la bolsa dañada (ej. rotos o perforados).
- No use micropocillos si el indicador del desecante ha cambiado de color azul a color rosado.

DECLARACIONES DE RIESGO Y PRECAUCIÓN

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

VIDA ÚTIL Y ALMACENAMIENTO

La fecha de caducidad está indicada en la etiqueta del kit. Almacene el kit de reactivos entre 2 y 8 C y regrese el kit al refrigerador inmediatamente después de cada uso. **Vuelva a colocar todos los micropocillos no usados en la bolsa original de papel de aluminio, y séllela enseguida. Es importante proteger las tiras de micropocillos de la humedad.**

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Deje que todos los componentes del kit, incluyendo la bolsa de micropocillos, alcancen la temperatura ambiente (22 a 25 C) antes de usarlos; **esto tarda aproximadamente una hora.** Prepare suficiente tamón de lavado 1X para el test. Para ello, mezcle una parte de Tampón de Lavado 20X II con 19 partes de agua purificada. La dilución 1X puede almacenarse a 22-25 C hasta un mes. Deseche la dilución de tampón de lavado 1X si está contaminada. Para realizar los lavados, puede transferir el tampón de lavado 1X un frasco de lavado. Alternativamente, puede usar un lavador automatizado de placas ELISA. NOTA: Los lavadores automatizados tienden a desperdiciar el tampón y agotar el PREMIER Tampón de Lavado 20X II prematuramente. Si necesita cantidades adicionales de este tampón llame al servicio técnico (513-271-3700).

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Con este kit pueden analizarse muestras de suero de sangre coagulada o LCR. Las muestras inactivadas por calor (30 minutos a 56 C) también son aceptables. No use LCR contaminado con sangre. Las muestras deben ser analizadas lo antes posible después de obtenidas, pero puede almacenarlas entre 2 y 8 C hasta 5 días antes del test. Si es necesario almacenarlas durante más tiempo, recomendamos congelar varias alcuotas (-20 a -80 C) para evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras. No deben guardarse en un congelador con descongelación automática.

Diluya las muestras de suero y LCR con el Diluyente de Muestras según se indica a continuación. Si se utiliza otro método para hacer las diluciones, el Diluyente puede agotarse prematuramente.

Suero

- Diluya el suero en la proporción 1:441 con Diluyente de Muestras:
 - Obtenga dos tubos de ensayo para cada muestra de suero. Transfiera 200 µL de Diluyente de Muestras al primer tubo y 400 µL al segundo tubo.
 - Transfiera 10 µL de suero al primer tubo y mezcle completamente.
 - Transfiera 20 µL de la primera dilución al segundo tubo y mezcle completamente.

LCR

Diluya el LCR en la proporción 1:21 con Diluyente de Muestras:

- Obtenga un tubo de ensayo para cada muestra de LCR y transfiera 400 µL de Diluyente de Muestras a cada tubo.
- Transfiera 20 µL de LCR al tubo con el Diluyente y mezcle completamente.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

NOTA: Cada micropocillo está recubierto interiormente con ambos antígenos, TP y CF. Es recomendable que los ensayos para IgM y IgG se realicen simultáneamente para todos los sueros.

- Desprenda un número suficiente de micropocillos para las muestras y los controles y colóquelos en el soporte de micropocillos. Registre la posición de cada muestra, como se ilustra a continuación. **Evite analizar más muestras de las que puedan cargarse en 6 minutos en el Paso 3.**

	1	2	3	4	5	6	
A	CP	DM	Pos. #1	Pos. #2	Pos. #3	Pos. #4	IgM
B	CP	DM	Pos. #1	Pos. #2	Pos. #3	Pos. #4	IgG

- Agregue 100 µL de Control Positivo (CP) a cada uno de 2 micropocillos diferentes (A1 y B1) y 100 µL de Diluyente de Muestras (DM) a cada uno de 2 pocillos diferentes (A2 y B2). **Esos últimos son considerados como Control Negativo.**
- Agregue 100 µL de cada muestra (diluida como se describió en la sección anterior) a 2 pocillos diferentes (en la hilera A y B, según sea necesario). Debe tener cuidado de no causar la contaminación cruzada de las muestras, ya que esto podría dar resultados erróneos. Mezcle girando suavemente el soporte de micropocillos sobre la mesa de trabajo durante 10 a 15 segundos.
- Incube entre 22 C y 25 C durante 30 minutos después de agregar todas las muestras y todos los controles.
- Sostenga el soporte de micropocillos firmemente de la parte inferior y apriételo suavemente.
 - Vuelque el contenido del soporte de micropocillos firmemente en un recipiente para materiales biológicos; invierta el soporte y sacúdalo firmemente sobre toallas de papel u otro material absorbente.
 - Llene todos los pocillos con el tampón de lavado 1X (use el frasco de lavado u otro dispositivo) dirigiendo el chorro del tampón hacia los costados de los pocillos para evitar que se forme espuma. Vuelque el contenido y sacuda el soporte de micropocillos sobre toallas de papel.
 - Repita 2 veces el ciclo de lavado (Paso 5b) para completar un total de 3 lavados. Después del lavado final, sacuda el soporte de micropocillos sobre toallas limpias con suficiente fuerza para eliminar el exceso de tampón de lavado lo más posible. No permita que los pocillos se sequen completamente en ningún momento.
- Agregue 2 gotas del Conjugado enzimático IgM a los micropocillos de la hilera A, o según sea necesario de acuerdo con el número de muestras.
- Agregue 2 gotas del Conjugado enzimático IgG a los micropocillos de la hilera B, o según sea necesario de acuerdo con el número de muestras. Mezcle suavemente girando el soporte de micropocillos sobre la mesa de trabajo durante 10 a 15 segundos.
- Incube entre 22 C y 25 C durante 30 minutos después de agregar los conjugados enzimáticos a todos los pocillos.
- Elimine los conjugados enzimáticos de cada micropocillo y lave 3 veces como se indicó en el Paso 5.
- Agregue 2 gotas de Substrato I a cada micropocillo. Fije el cronómetro en el momento de agregar el Substrato I al primer pocillo. Mezcle suavemente girando el soporte sobre la mesa de trabajo durante 10 a 15 segundos.
- Incube entre 22 C y 25 C durante 5 minutos.
- Agregue 2 gotas de Solución de Parada I (STOP) a cada pocillo, siguiendo el orden que usó en el Paso 10. Mezcle suavemente girando el soporte sobre la mesa de trabajo durante 10 a 15 segundos. Espere 2 minutos antes de hacer una lectura. Las lecturas deben completarse dentro de 15 minutos.
- Con cuidado, limpie la parte inferior de los micropocillos con una toalla que no suelte hilos, y mida la absorbancia.
 - Es preferible usar un espectrofotómetro de doble haz con capacidad de lectura a 450 nm y 630 nm. **HAGA UN BLANCO EN AIRE.**
 - Si utiliza un espectrofotómetro de haz único, lea la absorbancia a 450 nm como se indica a continuación:
 - Blanco en aire.
 - Tome una lectura en los micropocillos con el Control Negativo; los valores deben ser < 0,100.
 - Para compensar por el color de fondo, ponga el espectrofotómetro nuevamente en blanco utilizando los micropocillos de Control Negativo.
- Desinfecte y guarde el soporte de micropocillos. Deseche los materiales del ensayo usados de la manera apropiada para materiales con riesgo biológico.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Resultados

- Negativo = Valor de la absorbancia < 0,150
- Indeterminado = Valor de la absorbancia > 0,150 pero ≤ 0,199
- Positivo = Valor de la absorbancia ≥ 0,200

Un resultado negativo con IgM y IgG puede indicar que el anticuerpo contra los antígenos de *C. Immitis* está ausente, está presente pero debajo del nivel detectable del ensayo, o bien, que la muestra fue obtenida demasiado temprano para detectar una respuesta. Un resultado positivo para IgM o IgG indica la presencia de anticuerpos contra los antígenos de *C. immitis* y la respuesta debe reportarse positiva para cualquiera de los dos conjugados. Es posible que un paciente en la etapa inicial de la fase aguda de la enfermedad, sólo proporcione una respuesta para IgM, mientras que un paciente crónico o convaleciente sólo proporcione una respuesta para IgG.

Vuelva a analizar las muestras que proporcionen un resultado indeterminado y reporte el resultado del segundo test. Si el resultado del segundo test también es indeterminado, se debe obtener otra muestra. Las reacciones positivas extremadamente fuertes pueden producir un precipitado morado pocos minutos después de parar la reacción. Las absorbancias obtenidas con dichas reacciones pueden ser más bajas que las esperadas, pero aun así, son positivas.

CONTROL DE CALIDAD

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

- Con cada serie de muestras de pacientes debe analizarse un Control Positivo y un Control Negativo para garantizar el desempeño correcto de los reactivos.
- Los micropocillos con el Control Negativo (Diluyente de Muestras) deben proporcionar una absorbancia A_{450} de < 0,100 con los dos conjugados, IgM y IgG, cuando se hace un blanco en aire; o una absorbancia $A_{450/630}$ de < 0,050. Si se obtienen valores negativos ≤ - 0,005 es posible que el espectrofotómetro no esté funcionando correctamente.
- Los micropocillos con Control Positivo deben tener un color definitivamente amarillo y proporcionar una absorbancia A_{450} o $A_{450/630}$ de ≥ 0,500 y ≤ 2,500 para ambos conjugados, IgM y IgG.
- Antes de cada test, examine el kit visualmente para determinar si hay contaminación microbiana, congelación o fugas. En el Diluyente de Muestras, puede formarse un precipitado escamoso, pero éste no afecta el rendimiento del diluyente.
- Es recomendable anotar en un registro los resultados de cada control de calidad con el fin de asegurar la alta calidad de los procedimientos de ensayo y el cumplimiento con las pautas establecidas por los organismos reguladores.

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

Cada laboratorio debe establecer los valores esperados para una población determinada. La tasa de positividad puede variar según la zona geográfica, el método de recolección, manejo y transporte de la muestra, el test utilizado y la salud general de la población estudiada.

El inmunoensayo enzimático PREMIER *Coccidioides* EIA ha demostrado tasas de positividad de 42,5%, 4,0% y 2,5% en tres estudios clínicos prospectivos. Las infecciones coccidioides se manifestaron con mayor frecuencia en las regiones endémicas, en comparación con las zonas no endémicas.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El inmunoensayo enzimático PREMIER *Coccidioides* EIA está indicado para uso con muestras de LCR o suero. No se recomienda el uso de este test con otros tipos de muestra.
- Un resultado negativo para IgM y IgG no excluye el diagnóstico de coccidioidomycosis, particularmente si sólo se ha analizado una muestra y el paciente evidencia síntomas indicativos de un diagnóstico positivo.

- Un resultado positivo para IgM y IgG indica la presencia del anticuerpo contra *C. Immitis*. Los resultados positivos del ensayo EIA deben ser confirmados mediante un test por inmunodifusión. No obstante, debido a la relativa sensibilidad de los procedimientos por inmunodifusión, un resultado negativo con este método de ensayo (ID) no elimina la posibilidad de coccidioidomycosis.¹¹ El diagnóstico de coccidioidomycosis debe basarse en los datos de laboratorio y clínicos, así como en la presencia comprobada del anticuerpo.
- Los resultados positivos para IgM o IgG (no ambos) también sugieren la enfermedad, pero en diferentes etapas de desarrollo. Los pacientes en la etapa inicial de la fase aguda pueden presentar una respuesta positiva solamente para IgM. Asimismo, pacientes crónicos o convalecientes pueden presentar una respuesta positiva sólo para IgG. Estos resultados del test EIA deben compararse con los síntomas del paciente para determinar si existe una correlación lógica. Debido a que en estos casos los resultados para IgM y IgG no confirman uno al otro, es prudente obtener una confirmación adicional, particularmente si los síntomas no se correlacionan con uno de los resultados del test EIA. Los resultados positivos para ambos, IgM y IgG, sugieren, con un alto grado de confianza, la presencia de la enfermedad activa, pues los ensayos se confirman mutuamente.

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

El inmunoensayo enzimático PREMIER *Coccidioides* EIA fue evaluado en dos centros médicos de una zona endémica, un laboratorio central de referencia y en Meridian Bioscience, Inc. De las 1,315 muestras analizadas por *Coccidioides*, 1,242 fueron sueros y 73 líquido cefalorraquídeo. A continuación presentamos una comparación de los resultados obtenidos con los test EIA y de fijación de complemento. Cuando no hubo correlación entre los resultados de estos dos test, se utilizaron los resultados del método de inmunodifusión (ID) y/o de precipitina en tubo (TP) para resolver las discrepancias. Los resultados del test EIA para IgM y IgG se presentan separadamente y combinados. En la comparación de los resultados combinados, una muestra se consideró positiva si uno u otro, IgM o IgG, o ambos fueron positivos. Los resultados indicaron que se obtiene la mayor sensibilidad cuando el test EIA se realiza para ambos, IgM y IgG. Esta observación concuerda con la proposición de que los pacientes en la etapa inicial de la enfermedad aguda pueden tener una respuesta de tipo IgM solamente, mientras que los pacientes crónicos o convalecientes pueden tener una respuesta sólo de tipo IgG.

PREMIER EIA Sólo IgM	Fijación de Complemento		Resultos	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positivo	160	67	189	38
Negativo	75	971	65	981
Indeterminado	10	32	12	30

n=1,315

	vs. Fijación de Complemento	vs. Resultos
Sensibilidad relativa	68,1%	74,4%
Especificidad relativa	93,5%	96,3%
Concordancia total	86,0%	89,0%

Cuando se resolvieron las discrepancias entre los resultados de los test EIA para IgM y de fijación de complemento, 29 de las 67 muestras positivas con el test EIA, pero negativas con fijación de complemento, se confirmaron positivas con el test ID. Diez de las 75 muestras negativas con el test EIA y positivas en la fijación de complemento se confirmaron negativas por inmunodifusión.

PREMIER EIA Sólo IgG	Fijación de Complemento		Resultos	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positivo	214	69	248	35
Negativo	24	987	22	989
Indeterminado	7	14	8	13

n=1,315

	vs. Fijación de Complemento	vs. Resultos
Sensibilidad relativa	89,9%	91,9%
Especificidad relativa	93,5%	96,6%
Concordancia total	91,3%	94,1%

Cuando se resolvieron las discrepancias entre los resultados de los test EIA para IgG y de fijación de complemento, 34 de las 69 muestras positivas con el test EIA pero negativas con fijación de complemento, se confirmaron positivas con el test de ID. Dos de las 24 muestras negativas con el test EIA y positivas con fijación de complemento se confirmaron negativas por inmunodifusión.

PREMIER EIA IgM y IgG	Fijación de Complemento		Resultos	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positivo	228	99	267	60
Negativo	14	934	7	941
Indeterminado	3	37	3	37

n=1,315

	vs. Fijación de Complemento	vs. Resultos
Sensibilidad relativa	94,2%	97,4%
Especificidad relativa	90,4%	94,0%
Concordancia total	91,1%	94,7%

Cuando se resolvieron las discrepancias entre los resultados de los test EIA y de fijación de complemento para IgM y IgG, 39 de las 99 muestras positivas con el test EIA pero negativas con fijación de complemento, se confirmaron positivas con las pruebas de ID. Siete de las 14 muestras negativas con el test EIA y positivas con fijación de complemento se confirmaron negativas por inmunodifusión.

En un centro de estudio en la zona endémica, tres pacientes se diagnosticaron positivos para coccidioidomycosis por el test EIA pero negativo por cada uno de los métodos serológicos clásicos. Un test de muestras obtenidas de 2 a 14 días más tarde, confirmó que estos pacientes estaban afectados con la enfermedad en su forma aguda y que el test EIA había demostrado correctamente la presencia de anticuerpos en una etapa más temprana de la enfermedad que los métodos tradicionales.

REPRODUCIBILIDAD

Variabilidad dentro de la misma prueba – En una prueba se analizaron para IgM y IgG 12 repeticiones de tres sueros diferentes positivos conocidos para determinar la reproducibilidad dentro de la misma prueba. Cada una de las 12 repeticiones de muestra fue diluida a una sola proporción de 1:441.

Variabilidad dentro de la misma prueba				
Muestra	Abs. Media de IgM	D.E.	% de C.V.	
1	0,478	0,026	5,4	
2	0,477	0,033	6,9	
3	0,928	0,045	4,8	

Muestra	Abs. Media de IgG	D.E.	% de C.V.	
1	2,179	0,072	3,3	
4	1,132	0,069	6,1	
5	0,511	0,048	9,4	

Variabilidad entre prueba y prueba – En corridas múltiples, dos o más técnicos de laboratorio analizaron para IgM y IgG tres muestras con valores positivos conocidos. Cada técnico realizó diluciones en proporción 1:441 y luego ejecutó fotocolor del ensayo. En cada corrida, un solo técnico de laboratorio ejecutó pruebas de la muestra triplicada.

Variabilität dentro de la misma prueba			
Muestra	Abs. Media de IgM	D.E.	% de C.V.
6	0,532	0,033	6,1
7	0,562	0,064	11,4
8	1,020	0,071	7,0

Muestra	Abs. Media de IgG	D.E.	% de C.V.
6	2,082	0,170	8,2
9	1,147	0,080	7,0
10	0,520	0,069	13,4

REACTIVIDAD CRUZADA

Numerosos informeshan reportado el problema de una reacción cruzada significativa en los test de fijación de complemento, látex y otros inmunoensayos enzimáticos (EIA) para los anticuerpos contra *Coccidioides*,^{1,4} particularmente en pacientes con otras enfermedades micóticas, tales como histoplasmosis, blastomycosis y aspergilosis. Los datos a continuación demuestran que la especificidad general fue de 95,7% para las serologías positivas para anticuerpos contra varios organismos, así como para muestras que contenían factor reumatoide, anticuerpos antinucleares o antígenos criptocócicos y que fueron analizadas con el test PREMIER *Coccidioides*.

	Media de IgM	Media de IgG	Posición/Total	Especificidad
<i>Histoplasma</i>	0,043	0,041	4/79	95%
<i>Blastomyces</i>	0,026	0,025	0/9	100%
<i>Aspergillus</i>	0,062	0,039	2/20	90%
Factor reumatoide	0,060	0,015	0/10	100%
Acs.* antinucleares	0,026	0,010	0/7	100%
<i>Mycoplasma</i>	0,026	0,008	0/11	100%
<i>Cryptococcus</i>	0,007	0,008	0/8	100%
Influenza	0,016	0,009	0/5	100%
VIH	0,008	0,031	1/15	93%

*Acs = anticuerpos

DEUTSCH

PREMIER® COCCIDIOIDES

Ein Enzymimmunoassay (EIA) für den qualitativen Nachweis von IgM und IgG-Antikörpern gegen die TP und CF Antigene des *Coccidioides immitis* in Serum und in Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit

REF 603096

IVD

Rx Only

VERWENDUNGSZWECK

Der PREMIER *Coccidioides*-Enzymimmunoassay (EIA) ist zum qualitativen Nachweis von IgM- und IgG-Antikörpern in Serum und in der Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit bestimmt, die gegen die TP- und CF-Antigene des *Coccidioides immitis* gerichtet sind. Es wird empfohlen, dass die EIA positiven Ergebnisse durch einen Immunodiffusionstest bestätigt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS

C. immitis ist eine der Hauptursachen tiefliegender Mykosen. Obwohl dieser Pilz in den südwestlichen Bundesstaaten der USA und in Mexiko endemisch ist, hat das gesteigerte Reiseaufkommen in die endemischen Gebiete die Inzidenz auch in nichtendemischen Gebieten erhöht.^{1,2}

Die Coccidioidomykose stellt eine diagnostische Herausforderung an den Arzt und Laborchemiker. Die von *C. immitis* hervorgerufenen Läsionen sind u. U. schwerer von anderen Mykosen, von tuberkulösen Läsionen und Neoplasmen (sowohl gut- als auch bösartig) zu unterscheiden. Die Symptome sind oft unauffällig und können verschiedenen Pneumonien, Sarkoidosen, Karzinomen und anderen Erkrankungen ähnlich sein.^{1,2} Die Organismen sind kulturell und histologisch schwierig nachzuweisen, selbst bei wiederholten Versuchen.^{1,2}

Off bieten serologische Untersuchungen den einzig verfügbaren Nachweis, um eine vorläufige Diagnose zu stellen. Der serologische Nachweis kann dann der Ansatz zur Auswahl von definitiveren diagnostischen Techniken wie z.B. Kultur oder Biopsie sein. Komplementfixation, Immunodiffusion (ID) und Latexagglutination sind die hauptsächlichsten serologischen Methoden.¹ Das Tube Precipitin (TP)-Antigen ist ein 120 kDa Glykoprotein mit Kohlenhydratdeterminanten.^{3,4} Antikörper zu dem TP-Antigen können entweder mit dem Tube-Precipitin-Assay oder einem Immunodiffusionssystem nachgewiesen werden.^{5,6} Das Vorhandensein von Antikörpern zu dem TP-Antigen wird als ein Hinweis auf eine akute coccidioidale Erkrankung angesehen und ist hauptsächlich eine IgM-Reaktion. Das Komplementfixations- (CF)-Antigen ist ein hitzlabiles Protein. Antikörper zu dem CF-Antigen können entweder durch ID oder Komplementfixationssysteme während der fortgeschrittenen Stadien der Erkrankungen nachgewiesen werden.^{1,2,7,9} Der Komplementfixations-Assay wird zur Quantifizierung der IgG-Reaktion und zur Therapieüberwachung verwendet.^{1,2,7} Die Latexagglutination bietet eine sensible, schnelle, negative Möglichkeit des Screenings, mangelt aber ohne Bestätigung an Spezifität. Es gibt kein einzelnes im Handel erhältliches Assaysystem, das eine Screeningmöglichkeit für IgM- und IgG-Reaktionen auf sowohl TP- als auch CF-Antigen bietet.

Der PREMIER *Coccidioides*-EIA ist ein Schnelltest zum Nachweis von IgM und IgG zu sowohl TP- als auch CF-coccidioidenspezifischen Antigenen. Wenn der PREMIER *Coccidioides*-EIA in Verbindung mit weiteren Labor- und klinischen Befunden verwendet wird, kann er ein nützliches Werkzeug bei der Diagnose von durch *C. immitis* hervorgerufenen Infektionen sein.

BIOLOGISCHE PRINZIPIEN

Der PREMIER *Coccidioides*-EIA Test verwendet eine Mischung von gereinigten TP- und CF-Antigenen, die in Mikrotiterkavitäten absorbiert sind, um die relevanten IgM- und IgG-Antikörper einzufangen. Es wird verdünntes Probenmaterial in zwei verschiedene Mikrotiterkavitäten gegeben. Wenn Antikörper zu den coccidioidalen Antigenen vorhanden sind, binden sie sich an die absorbierten Antigene. Nach einem Waschvorgang, in dem ungebundene Probenkomponenten entfernt werden, wird ein Anti-IgM-Enzymkonjugat in eine Mikrotiterkavität gegeben. Ein Anti-IgG-Enzymkonjugat wird in eine andere Kavität gegeben. Wenn Patienten-Antikörper gebunden sind, bildet sich eine Sandwichreaktion zwischen den absorbierten Antigenen, den Patienten-Antikörpern und einem oder beiden Konjugaten. Nach einem Waschvorgang, in dem ungebundenes Konjugat entfernt wird, wird eine Substratlösung hinzugegeben. Es entwickelt sich dort eine Färbung, wo gebundenes Enzymkonjugat vorhanden ist.

REAGENZIENTHALTENE MATERIALIEN

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

- PREMIER *Coccidioides* Antigen-beschichtete Mikrotiterkavitäten – Plastikavitäten zum Abbrechen, beschichtet mit einer Mischung aus TP- und CF-Antigenen.
- PREMIER *Coccidioides* Positive Kontrolle – ein vorverdüntes, positives Humanserum mit Natriumazid (0,10 %) als Konservierungsmittel. Nicht mehr verdünnen.
- PREMIER *Coccidioides* Probenverdünnungsmittel – eine gepufferte Proteinlösung mit Natriumazid (0,10 %) als Konservierungsmittel.
- 20X Waschpuffer (PREMIER 20X Wash Buffer II) – ein konzentrierter Waschpuffer mit Thimerosal (0,2 %) als Konservierungsmittel.
- PREMIER *Coccidioides* IgM-Enzymkonjugat – Affinitätsgereinigtes Ziegen-Antihuman-IgM-Antikörper, konjugiert zu Meerrettich-Peroxidase in einer gepufferten Proteinlösung mit Thimerosal (0,02 %) als Konservierungsmittel.

- PREMIER *Coccidioides* IgG-Enzymkonjugat – Affinitätsgereinigtes Ziegen-Antihuman-IgG-Antikörper, konjugiert zu Meerrettich-Peroxidase in einer gepufferten Proteinlösung mit Thimerosal (0,02 %) als Konservierungsmittel.
- Substrat (PREMIER Substrate I) – Gepufferte Lösung mit Peroxid und Tetramethylbenzidin.
- Stopplösung (PREMIER Stop Solution I) – 1M Phosphorsäure. VORSICHT: Hautkontakt vermeiden. Mit Wasser spülen, falls es zu Hautkontakt kommt.
- Mikrotiterkavitäten-Halter.

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN

- Pipetten mit einem Abgabevermögen von 10 µL, 20 µL, 50 µL, 100 µL und 200 µL.
- Reagenzgläser (12 x 75 mm) zur Verdünnung der Probe.
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser.
- EIA-Plattenleser, der Extinktionen zu 450 nm lesen kann. Ein Zweistrahl-Photometer ist vorzuziehen, mit einem zweiten Filter von 630 nm zur Korrektur von Lichtstreuung.
- Spritzflasche oder automatischer EIA-Plattenwascher.
- Stopppuhr.
- Messzylinder zur Herstellung von 1X-Waschlösung.

VORSICHTSMASSNAHMEN

- Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro-Diagnostik bestimmt.
- Die Reagenzienkonzentration, die Inkubationszeiten und die Temperaturen wurden für Sensibilität und Spezifität optimiert. Für die besten Ergebnisse sollten diese Spezifikationen eingehalten werden.
- Die Patientenproben und die positive Kontrolle können infektiöse Stoffe enthalten. Die positive Kontrolle enthält Humanseren, die auf HBsAg und Antikörper zu HIV-1 untersucht und für negativ befunden wurden. Allerdings gibt es keinen Test, der eine hundertprozentige Garantie geben kann, dass menschliches Blut nicht HIV, Hepatitis oder andere infektiöse Stoffe übertragen kann. Die Patientenproben, die positive Kontrolle und alle Materialien, die mit ihr in Kontakt kommen, sollten nach Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt werden, wie es im CDC-/NIH-Handbuch "Biosafety in Microbiology and Biomedical Laboratories" (Biologische Sicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Labors) aus dem Jahr 1999 empfohlen wird.
- Alle Reagenzien sollten vor Gebrauch vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur verwendet werden.
- Kavitäten, IgM-Enzymkonjugat, IgG-Enzymkonjugat oder Positivkontrolle aus Testkits unterschiedlicher Chargennummer nicht austauschen. Der Probenverdünnungspuffer, der 20X Waschpuffer (PREMIER 20X Wash Buffer II), der Substrat (PREMIER Substrate I) und die Stopplösung (PREMIER Stop Solution I) sind chargenübergreifend verwendbar solange das Verfallsdatum nicht abgelaufen ist.
- Die Reagenzien Flaschen in geeignetem Abstand senkrecht über die Kavität halten, um eine sorgfältige Zugabe von Tropfen Größe zu gewähren.
- Die Flaschen mit den richtigen farbigen Deckeln verschließen.
- Vermeiden Sie Hautkontakt mit der Stopplösung I (1M Phosphorsäure). Sofort mit Wasser spülen, wenn ein Kontakt auftritt.
- Vermeiden Sie ein Verspritzen des verdünnten Stuhls beim Einfüllen in die Mikrotiterkavitäten, indem Sie die Spitze der Transferpipette ungefähr halb in die Kavität eintauchen und die Probe langsam an der Seite der Kavität herunter laufen lassen.
- Das Waschen der Mikrotiterkavitäten muss genau nach den Testanweisungen durchgeführt werden. Unzureichendes Waschen kann eine erhöhte Hintergrundextinktion in jedem ELISA-Protokoll verursachen.
- Mikrotiterkavitäten nicht verwenden, wenn der Folienbeutel beschädigt ist. (d.h. Löcher oder Einstiche vorhanden sind).
- Mikrotiterkavitäten nicht verwenden, wenn deren Trockenmittelindikator von Blau nach rosa umgeschlagen ist.

GEFAHREN UND SICHERHEITSHINWEISE

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

HALTBARKEIT UND LAGERUNG

Das Ablaufdatum ist auf dem Kiteikett angegeben. Lagern Sie den Kit bei 2 bis 8 C und stellen Sie ihn nach jeder Verwendung sofort in den Kühlschrank zurück. **Ungebrauchte Mikrotiterkavitäten müssen von dem Halter entfernt und zurück in den wieder verschließbaren Folienbeutel gelegt werden, der sofort nach der Öffnung wieder verschlossen werden muss. Es ist wichtig, die Kavitäten vor Feuchtigkeit zu schützen.**

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Den gesamten Kit, einschließlich des Beutels mit Mikrotiter-Kavitäten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (22-25 C) bringen. **Das Aufwärmen dauert mindestens eine Stunde.** Ausreichend einfach konzentrierten Arbeits-Puffer herstellen, indem Sie einen Teil 20X Waschpuffer (PREMIER 20X Wash Buffer II) abmessen und diesem mit 19 Teilen gereinigtem Wasser verdünnen. Der 1X Waschpuffer kann bis zu einem Monat lang bei 22-25 C aufbewahrt werden. Verwerfen Sie den Waschpuffer, wenn er kontaminiert wird. Zum Waschen kann der 1X Waschpuffer in eine Wasch- oder "Spritz"-Flasche gefüllt werden. Als Alternative kann ein automatischer Plattenwäscher verwendet werden. HINWEIS: Automatische Plattenwäscher tendieren dazu, mehr Puffer zu verbrauchen und können den 20X Waschpuffer daher schneller aufbrauchen. Rufen Sie falls notwendig den technischen Dienst an um zusätzlichen PREMIER 20X Waschpuffer (PREMIER 20X Wash Buffer II) zu bestellen.

PROBENNAHME UND -VORBEREITUNG

Serum aus koaguliertem Blut oder Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit kann mit diesem Kit getestet werden. Hitzeinaktivierte Proben (30 Minuten bei 56 C) sind ebenfalls akzeptabel. Verwenden Sie keine blutige Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit. Die Proben sollten sobald wie möglich getestet werden, können aber wenn notwendig bis zu fünf Tage lang bei 2 bis 8 C bis zum Testen aufbewahrt werden. Wenn eine längere Lagerung notwendig ist, wird empfohlen, dass mehrere Aliquote jeder Probe eingefroren werden (-20 bis -80 C), um ein mehrfaches Auftauen und Wiedereinfrieren zu verhindern. Lagern Sie diese Aliquote nicht in einem frostfreien Gefrierschrank.

Verdünnen Sie das Serum und die Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit wie im Folgenden beschrieben mit dem Probenverdünnungsmittel. Wenn die Verdünnung mittels eines anderen Schemas vorgenommen wird, kann dies zum verfrühten Aufbrauchen des Probenverdünnungsmittels führen.

Serum

- Verdünnen Sie das Serum 1:441 mit dem Probenverdünnungsmittel wie folgt:
- Verwenden Sie zwei Reagenzgläser für jede Serumprobe. Füllen Sie 200 µL des Probenverdünnungsmittels in das erste Reagenzglas und 400 µL in das zweite.
 - Geben Sie 10 µL Serum in das erste Reagenzglas und mischen Sie den Inhalt gründlich.
 - Geben Sie 20 µL der ersten Verdünnung in das zweite Reagenzglas und mischen Sie den Inhalt gründlich.

Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit

- Verdünnen Sie die Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit 1:21 mit dem Probenverdünnungsmittel wie folgt:
- Verwenden Sie ein Reagenzglas für jede Gehirn -Rückenmarksflüssigkeitsprobe und geben Sie 400 µL Probenverdünnungsmittel in jedes Reagenzglas.
 - Geben Sie 20 µL Gehirn -Rückenmarksflüssigkeit in das Verdünnungsreagenzglas und mischen Sie den Inhalt gründlich.

TESTDURCHFÜHRUNG

HINWEIS: Jede Kavität ist sowohl mit TP- als auch CF-Antigenen beschichtet. Es wird empfohlen, IgM- und IgG-Assays gleichzeitig für alle Seren durchzuführen.

- Trennen Sie eine hinreichende Menge an Kavitäten für die Proben und Kontrollen ab und schieben Sie die in den Kavitäten -Halter ein. Registrieren Sie die Probenpositionen, wie im folgenden Beispiel gezeigt wird. **Testen Sie nicht mehr Proben, als innerhalb von 6 Minuten in Schritt 3 geladen werden können.**

	1	2	3	4	5	6	
A	PK	PV	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	IgM
B	PK	PV	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	IgG

- Geben Sie jeweils 100 µL positive Kontrolle (PK) in 2 getrennte Kavitäten (A1 und B1) und jeweils 100 µL Probenverdünnungsmittel (PV) in 2 getrennte Kavitäten (A2 und B2). **Die letzteren Kavitäten dienen als negative Kontrolle.**

- Geben Sie 100 µL jeder Probe (verdünnt wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben) in 2 getrennte Kavitäten (in den Reihen A und B, je nach Bedarf). Geben Sie dabei Acht, dass Sie die Proben nicht untereinander kontaminieren, da dies zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Mischen Sie den Inhalt, indem Sie die Kavitäten 10 bis 15 Sekunden lang vorsichtig auf der Tischfläche schütteln.
- Inkubieren Sie die Kavitäten 30 Minuten lang bei 22 bis 25 C, wenn alle Proben und Kontrollen beigegeben worden sind.
- Halten Sie die Platte fest am Boden und drücken Sie sie vorsichtig zusammen.
 - Schütten Sie den Inhalt der Platte in einen Behälter für biologisches Gefahrengut und klopfen Sie die umgedrehte Platte fest auf einen Stapel sauberer Papiertücher oder ein anderes saugfähiges Material auf.
 - Füllen Sie alle Kavitäten mit 1X Waschpuffer (mit der Waschflasche oder einem anderen Gerät) und richten Sie den Pufferstrahl auf die Seitenwände der Kavitäten, um ein Aufschäumen zu verhindern. Schütten Sie den Inhalt der Platte weg und klopfen Sie die umgedrehte Platte auf Tücher auf.
 - Wiederholen Sie den Waschzyklus (Schritt 5b) weitere 2 Male (insgesamt 3 Waschvorgänge). Nach dem letzten Waschvorgang klopfen Sie die Platte stark genug auf Tücher auf, um soviel Überschuss an Waschpuffer wie möglich zu entfernen, lassen Sie die Kavitäten aber nicht vollständig austrocknen.
- Geben Sie 2 Tropfen des IgM-Enzymkonjugats in die Kavitäten in der Reihe A, je nach Anzahl der Proben.
- Geben Sie 2 Tropfen des IgG-Enzymkonjugats in die Kavitäten in der Reihe B, je nach Anzahl der Proben. Mischen Sie den Inhalt, indem Sie die Kavitäten 10 bis 15 Sekunden lang vorsichtig auf der Tischfläche schütteln.
- Inkubieren Sie die Platte 30 Minuten lang bei 22 bis 25 C.
- Entfernen Sie die Enzymkonjugate aus den Kavitäten und waschen Sie sie dreimal aus, wie in Schritt 5 beschrieben.
- Geben Sie 2 Tropfen Substrat in jede Kavität. Stellen Sie die Stoppuhr, wenn das Substrat in die erste Kavität hinzugegeben wird. Mischen Sie den Inhalt, indem Sie die Kavitäten 10 bis 15 Sekunden lang vorsichtig auf der Tischfläche schütteln.
- Inkubieren Sie die Platte 5 Minuten lang bei 22 bis 25 C.
- Geben Sie 2 Tropfen Stopplösung in jede Kavität in derselben Reihenfolge wie bei Schritt 10. Mischen Sie den Inhalt, indem Sie die Kavitäten 10 bis 15 Sekunden lang vorsichtig auf der Tischfläche schütteln und warten Sie 2 Minuten. Lesen Sie dann die Ergebnisse ab. Die Ablesung sollte innerhalb von 15 Minuten erfolgen.
- Die Unterseite der Kavitäten mit einem fusselfreien Tuch vorsichtig abwischen und die Extinktion messen.
 - Ein Zweistrahl-Photometer ist vorzuziehen, wobei die Extinktionen bei 450 nm und bei 630 nm abgelesen werden. GEGEN LUFT EICHEN.
 - Wenn ein Einstrahl-Photometer verwendet wird, lesen Sie die Extinktion bei 450 nm wie folgt ab:
 - Gegen Luft eichen.
 - Die negativen Kontrollkavitäten ablesen. Werte sollte unter 0,100 liegen.
 - Den Photometer wieder gegen die negativen Kontrollkavitäten eichen, um für den Hintergrund zu kompensieren.
- Desinfizieren Sie den Kavitätenhalter und bewahren Sie ihn auf. Verwerfen Sie die gebrauchten Assay-Materialien als biologischen Abfall.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Ergebnisse
 Negativ = Extinktionswert < 0,150
 Unbestimmt = Extinktionswert ≥ 0,150, aber ≤ 0,199
 Positiv = Extinktionswert ≥ 0,200

Ein negatives Resultat mit IgM sowie IgG zeigt entweder die Abwesenheit von Antikörpern gegen *C. immitis*-spezifischen Antigenen an, oder daß die Menge der Antikörper unterhalb der Nachweisgrenze des Tests liegt, oder daß die Probe zu früh für die Reaktion entnommen wurde. Ein positives Ergebnis mit entweder IgM oder IgG impliziert die Anwesenheit von Antikörpern gegen *C. immitis*-spezifischen Antigenen und sollte berichtet werden. Ein Patient, der sich in einer frühen akuten Phase befindet, kann u.ü. nur eine IgM-Reaktion vorweisen, während ein chronisch Kranker oder genesender Patient nur eine IgG-Reaktion zeigen mag.

Testen Sie die Proben erneut, die ein unbestimmtes Ergebnis aufweisen und berichten Sie das Ergebnis der erneuten Testung. Wenn das Resultat der erneuten Testung immer noch unbestimmt ist, sollte eine zweite Probe entnommen werden. Besonders starke positive Reaktionen können innerhalb einiger Minuten nach dem Stoppen der Reaktion eine purpurfarbene Ausfällung zeigen. Die Extinktionswerte, die mit solchen Reaktionen beobachtet werden, können geringer als erwartet ausfallen, sind aber immer noch positiv.

QUALITÄTSKONTROLLE

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

- Die positiven und negativen Kontrollen müssen bei jedem Ansatz von Patientenproben durchgeführt werden, um die Qualitätskontrolle der Reagenzien zu gewährleisten.
- Die Kavitäten der negativen Kontrolle (Probenverdünnungsmittel) sollten einen A₄₅₀-Wert < 0,100 mit sowohl den IgM- als auch IgG-Konjugaten ergeben, wenn gegen Luft geeicht, oder einen A_{450/630}-Wert < 0,050. Negative Werte ≤ -0,005 können ein Hinweis auf ein Problem mit dem EIA-Plattenleser sein.
- Die Kavitäten der positiven Kontrolle sollten eine deutlich gelbe Farbe haben und einen A₄₅₀-Wert oder A_{450/630}-Wert von ≥ 0,500 und ≤ 2,500 sowohl mit dem IgM- als auch dem IgG-Konjugat aufweisen.
- Bei jedem Gebrauch sollten die Kitbestandteile visuell auf offensichtliche Anzeichen von mikrobieller Kontamination, Erfrierung oder Auslaufen überprüft werden. Das Probenverdünnungsmittel kann ausflocken, was aber seine Leistungsfähigkeit nicht beeinträchtigt.
- Es wird empfohlen, die Ergebnisse jeder Qualitätsüberprüfung in einem angemessenen Logbuch festzuhalten, um qualitativ hochwertige Testungen beizubehalten und die Bestimmungen der Aufsichtsbehörden einzuhalten.

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

ERWARTETE WERTE

Die erwarteten Werte für eine bestimmte Bevölkerung sollten für jedes Labor festgelegt werden. Die Positivrate kann in Abhängigkeit von der geographischen Lage, der Methode der Probenentnahme, der Verarbeitung und des Transports, des verwendeten Tests und dem allgemeinen Gesundheitszustandsumgebung der untersuchten Patientenbevölkerung variieren.

Der PREMIER *Coccidioides* EIA-Test hat positive Raten von 42,5%, 4,0% und 2,5% in drei prospektiven klinischen Studien ergeben. Die Häufigkeit der coccidioidalen Infektion war in der endemischen Region größer als in der nichtendemischen Gegend.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Der PREMIER *Coccidioides* EIA-Test ist zur Verwendung mit Gehirn-Rückenmarksflüssigkeits- und Serumproben bestimmt. Es wird nicht empfohlen, den Test mit anderen Proben durchzuführen.
- Ein negatives Resultat mit sowohl IgM als auch IgG schließt die Diagnose einer Coccidioidomykose nicht aus, besonders, wenn nur eine einzelne Probe getestet wurde und der Patient Symptome zeigt, die mit einer positiven Diagnose übereinstimmen.
- Ein positives Ergebnis mit entweder IgM oder IgG impliziert das Vorhandensein von Antikörpern gegen *C. immitis*. Positive EIA-Ergebnisse sollten durch einen Immundiffusionstest bestätigt werden. Allerdings schließt ein ID-negatives Ergebnis wegen der relativen Insensibilität der ID-Verfahren die Möglichkeit einer Coccidioidomykose nicht aus.¹¹ Die Diagnose der Coccidioidomykose beruht auf Labor- und klinischen Befunden sowie dem Vorhandensein von Antikörpern.
- Positive Ergebnisse mit entweder IgM oder IgG (aber nicht beiden Konjugaten zugleich) legen ebenfalls eine coccidioidale Erkrankung nahe, aber in unterschiedlichen Erkrankungsstadien. Ein Patient in einer frühen akuten Phase kann u.ü. nur eine IgM-Reaktion vorweisen, während ein chronisch Kranker oder genesender Patient nur eine IgG-Reaktion zeigt. Derartige EIA-Ergebnisse sollten mit den Symptomen des Patienten verglichen werden. Da IgM- und IgG-Resultate sich in diesen Fällen nicht gegenseitig bestätigen, ist eine zusätzliche Bestätigung ratsam, besonders, wenn die Symptome des Patienten nicht mit dem einzelnen EIA-Ergebnis übereinstimmen. Positive Ergebnisse mit sowohl IgM als auch IgG sind ein entschiedener Hinweis darauf, dass sehr wahrscheinlich eine aktive Erkrankung vorliegt, weil diese Assays sich gegenseitig bestätigen.

LEISTUNGSMERKMALE

Der PREMIER *Coccidioides* EIA Test wurde in zwei medizinischen Zentren in einem endemischen Gebiet, einem zentralen Referenzlabor und bei Meridian Bioscience, Inc. bewertet. Von den 1,315 zur *Coccidioides*-Testung abgegebenen Proben waren 1.242 Seren und 73 Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit. Ein Vergleich der mit dem EIA und der Komplementfixationsmethode erhaltenen Tests wird in den folgenden Tabellen dargestellt. In den Fällen, in denen die Ergebnisse des EIA und der Komplementfixation nicht übereinstimmen, wurde die Diskrepanz mit Immundiffusions (ID-) und/oder Tube-Precipitin (TP)-Ergebnissen aufgelöst. Die EIA-Ergebnisse für IgM und IgG werden getrennt und kombiniert dargestellt. Für den kombinierten Vergleich wurde eine Probe als positiv befunden, wenn entweder IgM, IgG oder beide Resultate positiv waren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die größte Sensibilität erreicht wird, wenn sowohl IgM- als auch IgG-EIA unternommen werden. Diese Beobachtung stimmt mit dem Begriff überein, dass Patienten in der frühen akuten Phase u.ü. nur eine IgM-Reaktion aufweisen können, während der chronisch Kranke oder genesende Patient lediglich eine IgG-Reaktion zeigen kann.

PREMIER EIA Nur für IgM	Komplement- fixation		Auflösung	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positiv	160	67	189	38
Negativ	75	971	65	981
Unbestimmt	10	32	12	30

n=1,315

	Im Vergleich zur Komplementfixation	Im Vergleich zur Auflösung
Relative Sensibilität	68,1%	74,4%
Relative Spezifität	93,5%	96,3%
Gesamte Übereinstimmung	86,0%	89,0%

Wenn die Diskrepanzen zwischen den EIA IgM-Ergebnissen und der Komplementfixation aufgelöst wurden, wurden 29 der 67 Proben, die nach dem EIA positiv, aber nach der Komplementfixation negativ waren, nach den ID-Assays als positiv bestätigt. Zehn der 75 Proben, die nach dem EIA negativ und nach der Komplementfixation positiv waren, waren ID-negativ.

PREMIER EIA Nur für IgG	Komplement- fixation		Auflösung	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positiv	214	69	248	35
Negativ	24	987	22	989
Unbestimmt	7	14	8	13

n=1,315

	Im Vergleich zur Komplementfixation	Im Vergleich zur Auflösung
Relative Sensibilität	89,9%	91,9%
Relative Spezifität	93,5%	96,6%
Gesamte Übereinstimmung	91,3%	94,1%

Wenn die Diskrepanzen zwischen den EIA IgG-Ergebnissen und der Komplementfixation aufgelöst wurden, wurden 34 der 69 Proben, die nach dem EIA positiv, aber nach der Komplementfixation negativ waren, nach den ID-Assays als positiv bestätigt. Zwei der 24 Proben, die nach dem EIA negativ und nach der Komplementfixation positiv waren, waren ID-negativ.

PREMIER EIA Nur für IgM und IgG	Komplement- fixation		Auflösung	
	Pos	Neg	Pos	Neg
Positiv	228	99	267	60
Negativ	14	934	7	941
Unbestimmt	3	37	3	37

n=1,315

	Im Vergleich zur Komplementfixation	Im Vergleich zur Auflösung
Relative Sensibilität	94,2%	97,4%
Relative Spezifität	90,4%	94,0%
Gesamte Übereinstimmung	91,1%	94,7%

Wenn die Diskrepanzen zwischen den EIA IgG- und IgM-Ergebnissen und der Komplementfixation aufgelöst wurden, wurden 39 der 99 Proben, die nach dem EIA positiv, aber nach der Komplementfixation negativ waren, nach den ID-Assays als positiv bestätigt. Sieben der 14 Proben, die nach dem EIA negativ und nach der Komplementfixation positiv waren, waren ID-negativ.

An einem Studienort im endemischen Gebiet wurden drei Patienten nach dem EIA als positiv befunden, während jeder dieser Patienten nach allen klassischen serologischen Methoden negativ waren. Die erneute Testung einer nachfolgenden Probe von 2 bis 14 Tagen darauf bestätigte, dass diese Patienten an der akuten Erkrankung litten und dass der EIA die Antikörper korrekterweise zu einem früheren Stadium als die herkömmlichen Methoden demonstriert hatte.

REPRODUZIERBARKEIT

Intra-Assay-Variabilität Zwölf Replikate von drei verschiedenen bekanntermaßen positiven Seren wurden auf sowohl IgM wie auch IgG in einem Assay getestet, um die Wiederholbarkeit innerhalb des Assays festzustellen. Alle 12 Replikate jeder Probe wurden mit einer einzelnen Verdünnung von 1:441 vorgenommen.

Probe	Intra-Assay-Variabilität		
	Durchschnitt IgM Abs.	Standardabweichung	% Variationskoeffizient
1	0,478	0,026	5,4
2	0,477	0,033	6,9
3	0,928	0,045	4,8

Probe	Intra-Assay-Variabilität		
	Durchschnitt IgG Abs.	Standardabweichung	% Variationskoeffizient
1	2,179	0,072	3,3
4	1,132	0,069	6,1
5	0,511	0,048	9,4

Inter-Assay-Variabilität: Drei bekanntermaßen positive Proben wurden auf sowohl IgM wie auch IgG in mehreren Assays getestet, die von mindestens zwei Personen durchgeführt wurden. Jeder Tester führte die Verdünnung von 1:441 durch und befolgte im Anschluss das Assay-Protokoll. Jeder Durchlauf bestand aus Triplikaten jeder Probe und wurde von einem einzelnen Tester durchgeführt.

Probe	Inter-Assay-Variabilität		
	Durchschnitt IgM Abs.	Standardabweichung	% Variationskoeffizient
6	0,532	0,033	6,1
7	0,562	0,064	11,4
8	1,020	0,071	7,0

Probe	Inter-Assay-Variabilität		
	Durchschnitt IgG Abs.	Standardabweichung	% Variationskoeffizient
6	2,082	0,170	8,2
9	1,147	0,080	7,0
10	0,520	0,069	13,4

KREUZREAKTIVITÄT

Zahlreiche Berichte haben ein signifikantes Problem einer Kreuzreaktion mit Komplementfixation, Latextest und anderen EIA-Assays für coccidioidale Antikörper vermerkt,¹⁻⁴ im besonderen bei Patienten, die an anderen mykotischen Erkrankungen wie Histoplasmose, Blastomykose und Aspergillose litten. Die folgenden Daten zeigen, dass die gesamte Spezifität 95,7% betrug, wenn Proben, die serologisch positiv für Antikörper gegen verschiedene Organismen ausfielen und Proben, die einen rheumatoiden Faktor, antinukleare Antikörper oder Cryptococcus-spezifisches Antigen aufwiesen, mit PREMIER *Coccidioides* getestet wurden.

	Durchschnitt IgM	Durchschnitt IgG	Positiv von insgesamt	Spezifität
<i>Histoplasma</i>	0,043	0,041	4/79	95%
<i>Blastomyces</i>	0,026	0,025	0/9	100%
<i>Aspergillus</i>	0,062	0,039	2/20	90%
Rheumatoider Faktor	0,060	0,015	0/10	100%
Antinukleare Antikörper	0,026	0,010	0/7	100%
<i>Mycoplasma</i>	0,026	0,008	0/11	100%
<i>Cryptococcus</i>	0,007	0,008	0/8	100%
Influenza	0,016	0,009	0/5	100%
HIV	0,008	0,031	1/15	93%

REFERENCES

- Pappagianis D and BL Zimmer. Serology of coccidioidomycosis. Clin Microbiol Reviews 1990;3:247-268.
- Bronnmann DA, JN Galgiani. Coccidioidomycosis Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1989;8:466-473.
- Cole GT, D Kruse, S Zhu, KR Seshan, and RW Wheat. Composition, serologic reactivity, and immunolocalization of a 120-kilodalton tube precipitin antigen of *Coccidioides immitis*. Infect Immun 1990;58:179-188.
- Cole GT, D Kruse, and KR Seshan. Antigen complex of *Coccidioides immitis* which elicits a precipitin antibody response in patients. Infect Immun 1991;59:2434-2446.
- Huppert M and JW Bailey. The use of immunodiffusion tests in coccidioidomycosis. Amer J Clin Path 1965;44:364-368.
- Kaufman L. Value of immunodiffusion tests in the diagnosis of systemic mycotic diseases. Ann Clin Lab Sci 1973;3:141-146.
- Smith CE, MT Saito, and SA Simons. Pattern of 39,500 serologic tests in coccidioidomycosis. J Amer Med Assoc 1956;160:546-552.
- Cox, RA and LA Britt. Isolation of a coccidioidin component that reacts with immunoglobulin M precipitin antibody. Infect Immun 1986;53:449-453.
- Zimmer BL and D Pappagianis. Characterization of a soluble protein of *Coccidioides immitis* with activity as an immunodiffusion-complement fixation antigen. J Clin Microbiol 1988;26:2250-2256.
- Data on file (submitted to ASM for May 1992 meeting. Manuscript to be submitted to J Clin Microbiol, 1992).
- Kaufman L and MJ Clark. Value of the concomitant use of complement fixation and immunodiffusion tests in the diagnosis of coccidioidomycosis. Applied Microbiol 1974;28:641-643.



SN11130

REV. 08/17

 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.eu

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

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

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

INTERNATIONAL SYMBOL USAGE

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

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

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL -	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo medico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostika 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 Probenzubereitung, in dem sich Probenverdünnungspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero de catalogo / Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer		Do not freeze / Non congelare / Ne pas congeler / No congelar / Nicht Einfrieren
	Consult Instructions for Use / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulter les instructions d'utilisation / Consultar las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Reagents IVD reserves à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur für IVD Leistungsbewertung
	Contains sufficient for n tests / Contiene sufficiente per n test / Contenu suffisant pour n tests / 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 / Límites de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugat 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 / Testgerät	REAG	Reagent / Reagents / 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 / Miso 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 di lavaggio 20X / Solution de lavage concentrée 20X / Solución tampón de lavado 20X / 20fach konzentriertes Waschkonzentrat
R. 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 Détection / 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.