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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DEUTSCH

Cryptococcal Antigen Latex Agglutination System (CALAS®)

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

REF **140100, 140050** IVD **In-Vitro-Diagnostikum**

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

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

Kaufman und Blumer[9] berichteten, dass das *C. neoformans* Antigen in 86% von 330 gesicherten Fällen von Cryptococcus-Meningitis sowohl im Serum als auch im Liquor vorkam. Das Antigen war im Liquor von 99% dieser Fälle, aber nur in 87% der Serumproben nachweisbar. Die kombinierte Untersuchung von Serum- und Liquorproben erlaubte den Nachweis des Antigens in jedem gesicherten Fall, parallele serologische Untersuchungen sowohl auf das Antigen als auch auf Antikörper sind zur Absicherung des Nachweises von extrameningealer Kryptokokkose zu empfehlen.

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

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

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

REAGENZIEN/ENTHALTENE MATERIALIEN
Die Höchstzahl der mit diesem Testkit durchführbaren Tests ist auf der Aussenseite der Packung angegeben.

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

BENÖTIGTE, ABER NICHT ENTHALTENE MATERIALILEN

gereinigtes Wasser	kleine Reagenzröhrchen für die Serologie
1x 0,01 mL Pipetten	Reagenzröhrchen-Ständer
Agitator (optional)	Stift zum Beschriften
Spatel	25 µL, 100 µL, 200 µL (oder gleichwertige) Pipetten

Wasserbad oder Heizblock (56 C und 100 C)

VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Sämtliche Reagenzien sind ausschließlich für die In-vitro- Diagnostik bestimmt.
2. Die Kontrollen müssen an jedem Analysentag vor den Patientenproben getestet werden.
3. Alle Reagenzien eines Testkits sind aufeinander abgestimmt; es kann zu falschen Ergebnisse kommen, wenn die Reagenzien von Testkits mit unterschiedlicher Chargennummer ausgetauscht werden.
4. Keine Reagenzien mit Fremdstoffen, Partikeln oder Aggregaten, die auf Verunreinigungen, eine falsche Lagerung oder Handhabung hindeuten, verwenden.
5. Die Proben dürfen keine bakteriellen oder andere sichtbare Anzeichen von Verunreinigungen aufweisen.
6. Die **Negative-Kontrolle an jedem Analysentag hitzeinaktivieren**. Anderenfalls können sich bestimmte Globuline neu bilden und können so zu falsch positiven Testergebnissen führen.

7. Das **Antikörper-Kontroll**-Reagenz **niemals** hitzeinaktivieren, da dies zu abweichenden Kontrollreaktionen führen kann.
8. Natriumazid ist hautreizend. Hautkontakt mit den Testbestandteilen vermeiden. Nicht mit Säure mischen, da dies zur Bildung eines Hydrogenazid und eines extrem toxischen Gas führen kann.
9. Die Proben nicht in einem selbstabtauenden Gefriergerät lagern. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben kann die Testergebnisse beeinflussen.
10. Es sollte darauf geachtet werden, dass keine Synärese-Flüssigkeit, die in verschiedenen Agartypen vorkommt, in eine Probe vor der Analyse gelangt, da dies zu verfälschten Ergebnissen führen kann.

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

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

Die wiederaufgelöste Pronase kann bei 2-8 C ungefähr einen Monat gelagert werden. Die Lösung verwerfen, wenn sie trübe wird oder verunreinigt ist. Die fertige Pronaselösung sollte aliquotiert und eingefroren werden, wenn sie nicht innerhalb eines Monats aufgebraucht wird. Eingefrorene Aliquots von Pronase können bis zum Haltbarkeitsdatum auf dem Etikett des Pronase-Fläschchens aufbewahrt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. **Nicht** in einem selbst abtauenden Gefriergerät aufbewahren. Das Haltbarkeitsdatum von jedem CALAS-Testkit steht auf dem Etikett des Kits. Den Kit nicht weiter benutzen, wenn die beigefügten Kontrollen nicht die richtigen Reaktionen zeigen. In diesem Falle und wenn die Reagenzien noch nicht abgelaufen sind, wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von Meridian Bioscience.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN
Die folgenden Reagenzien mit dem angegebenen Volumen deionisierten Wassers wiederauflösen:
a. **Antikörper-Kontrolle:** 1,45 mL
b. **Negativ-Kontrolle** 2,40 mL
c. **Pronase** 2,50 mL
Die fertige Pronase-Lösung sollte aliquotiert und eingefroren werden, wenn sie nicht innerhalb eines Monats aufgebraucht wird.

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

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

PROBENNAHME UND - VORBEREITUNG
A. **Liquor cerebrospinalis** (Meridian *empfiehlt nicht* die routinemäßige Vorbehandlung von Liquorproben mit Pronase. Neue Erkenntnisse[14] lassen jedoch darauf schließen, dass die Pronase-Behandlung von Liquor bei einigen Proben von Nutzen sein kann.)
   1. Probe aseptisch nach anerkannten Methoden gewinnen.
   2. Bei 1000 xg 15 Minuten lang zentrifugieren, um sicherzustellen, dass weiße Blutkörperchen und andere Partikel entfernt sind.
   3. Den Liquor vorsichtig in ein steriles Gefäß aufziehen und verschließen.
   4. Die Probe kann entweder sofort weiter bearbeitet werden oder sie kann gekühlt werden oder bei -20 C eingefroren werden oder durch die Zugabe von Thiomersal bis zu einer Endkonzentration von 0,01% konserviert werden.
   5. **Wir empfehlen die Inaktivierung von Liquor durch fünfminütiges Erhitzen im kochenden Wasserbad vor jedem Test.**[7] Dies führt zur Einschränkung unspezifischer Interferenzen.
   6. 3-4 Minuten vor der Analyse abkühlen lassen.

B. **Serum** (Es wird empfohlen, alle Serumproben mit Pronase wie unten beschreiben zu behandeln.)
   1. Vollblut aseptisch gemäß den laboreigenen Standards gewinnen. Die Probe darf keine Antikoagulanzien enthalten, da dies den Test ungültig macht.
   2. Blut 10 Minuten lang bei Raumtemperatur im Abnahmegefäß gerinnen lassen.
   3. Bei 1000 xg 15 Minuten lang zentrifugieren.
   4. Serum vorsichtig in ein steriles Gefäß aufziehen und verschließen.
   5. Die Probe kann entweder sofort weiter bearbeitet werden oder sie kann gekühlt werden oder bei -20 C eingefroren werden oder durch die Zugabe von Thiomersal bis zu einer Endkonzentration von 0,01% konserviert werden.
   6. 200 µL der Serumprobe zu 200 µL der Pronase-Lösung geben.
   7. Die Serum-Pronase-Lösung bei 56 C 15 Minuten lang inkubieren.
   8. Danach die Serum-Pronase-Lösung sofort volle fünf Minuten lang kochen, um den enzymatischen Abbau abzubrechen.
   9. Die Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
   10. Die Probe ist nun fertig zur Analyse (siehe **TESTDURCHFÜHRUNG**).

   ACHTUNG: Beim Titrieren beachten, dass die Probe 1:2 mit Pronase-Lösung verdünnt wurde.

C. **Negativ-Kontrolle** - Die **Negativ-Kontrolle** bei 56 C 30 Minuten lang hitzeinaktivieren. Sie muss an jedem Analysentag inaktiviert werden.

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

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

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

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

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

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

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

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

Patientenproben:

A. **Negativ**: wenn eine negative oder eine 1+-Reaktion beim anfänglichen Screening-Test gegen **Testlatex** beobachtet wurde, wird die Probe als negativ eingestuft. 1+-Reaktionen lassen jedoch auf Cryptococcus schließen.[9] Wenn der Zustand des Patienten auf eine Cryptococcus-Infektion schließen lässt, werden weitere Probenanalysen und die Anlage einer Kultur dringend empfohlen. Wird ein Prozonenphänomen vermutet, den Patiententest in einer 1:10 und 1:100 Verdünnung der Probe in dem mitgelieferten **Proben-Verdünnungspuffer** wiederholen.

B. **Positiv**: wenn eine 2+ oder eine stärkere Reaktion gegen das **Testlatex** im anfänglichen Screening-Test beobachtet wird, wird die Probe mit dem **Testlatex** und dem **Kontrolllatex** titriert. Der Titer wird mit der höchsten Verdünnungsstufe, die eine 2+ oder stärkere Reaktion zeigt, angegeben. Obwohl Liquor-Titer von 1:4 oder weniger ein Indizienbeweis für eine *C. neoformans*-Infektion des zentralen Nervensystems sind, sind zusätzliche Folgeuntersuchungen und das Anlegen einer Kultur dringend zu empfehlen. Liquor-Titer von 1:8 oder mehr bei Patienten mit Meningitis lassen stark auf eine Infektion mit *C. neoformans* schließen. Die Rate falsch positiver Ergebnisse mit Seren, die nicht mit Pronase vorbehandelt wurden und die Titer von 1:8 oder weniger zeigen, kann bis zu 32% hoch sein.[9] Geeignete Folgeuntersuchungen sind dringend zu empfehlen.

C. **Positiv mit unspezifischen Interferenzen**: wenn der Probentiter mit dem **Testlatex** wenigstens 4fach höher als der unspezifische Interferenz-Titer (**Kontrolllatex**) liegt (z.B. **Testlatex**-Titer 1:32, **Kontrolllatex**-Titer 1:8 oder weniger), sollte der Test als „positiv mit unspezifischen Interferenzen“ eingestuft werden; dabei sollten die Probentiter gegen das **Testlatex** und das **Kontrolllatex** angegeben werden.[1, 11]

D. **Ungültig aufgrund unspezifischer Interferenzen**: wenn der Probentiter gegen das **Testlatex** nicht wenigstens 4fach höher als der gegen das **Kontrolllatex** ist, sollte der Test als „ungültig aufgrund unspezifischer Interferenzen“ eingestuft werden[1, 11] (siehe EINSCHRÄNKUNGEN).

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

QUALITÄTSKONTROLLE

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

KONTROLLE DER PRONASEAKTIVITÄT

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

CALAS-KONTROLLEN

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

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 Reakionen nicht erzielen, bitte rufen Sie den Technischen Support von Meridian Bioscience an (USA): (001) 800-343-3858 oder wenden Sie sich an Ihren zuständigen Auslieferer.

ERWARTETE WERTE

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

EINSCHRÄNKUNGEN

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

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

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

LEISTUNGSMERKMALE

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

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

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

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

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

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

Wenn der CALAS-Test (mit Pronase) direkt mit der ursprünglichen Pronase-Methode nach Stockman und Roberts[12] verglichen wurde, ergab sich eine 100%ige Übereinstimmung bei 18 positiven und 16 negativen getesteten Proben. Die Titer dieser beiden Pronase-Methoden wichen nicht signifikant voneinander ab (bei 2facher-Verdünnung). So konnte bewiesen werden, dass die Pronase-Methoden gleichwertig und reproduzierbar sind.

REFERENCES

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

CE

SN10100 **REV. 07/14**

Manufactured By

Meridian Bioscience, Inc.
USA/Corporate Office
3471 River Hills Drive
Cincinnati, Ohio 45244
Telephone: (513) 271-3700
Orders/Customer Service:
(800) 543-1980
Technical Support Center:
(800) 343-3858
Information Fax:(513) 272-5432
Ordering Fax:(513) 271-0124

EC REP
Authorized Representative

Meridian Bioscience Europe
Via dell' Industria, 7
20020 Villa Cortese (MI)
Italy
Tel.: +39 0331 433636
Fax: +39 0331 433616
e-mail: info@meridianbioscience.eu

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

Meridian Bioscience Europe b.v.
Halderheiweg 6
5282 SN Boxtel
The Netherlands
Tel.: +31 (0) 411 62 11 66
Fax: +31 (0) 411 62 48 41
e-mail: info.bnl@meridianbioscience.eu

Meridian Bioscience Europe France
34, rue de Ponthieu
75008 Paris
France
Tel.: +33 (0) 1 42 56 04 40
Fax: +33 (0) 9 70 06 62 10
e-mail: info.fr@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, Erläuterung der graphischen symbole)

	Use By / Utilizzare entro / Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis	CONTROL +	Positive control / Controllo positivo / Contrôle positif / Control positivo / Positive Kontrolle
LOT	Batch Code / Codice del lotto / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung	CONTROL −	Negative control / Controllo negativo / Contrôle négatif / Control negativo / Negative Kontrolle
IVD	In vitro diagnostic medical device / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / In-Vitro-Diagnostikum	EC REP	Authorized Representative in the European Community / Rappresentante Autorizzato nella Comunità Europea / Mandataire dans la Communauté européenne / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
CE	This product fulfills the requirements of Directive 98/79/EC on in vitro diagnostic medical devices / Questo prodotto soddisfa i requisiti della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro / Ce produit répond aux exigences de la Directive 98/79 CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / Este producto cumple con las exigencias de la Directiva 98/79/CE sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Dieses Produkt entspricht den Anforderungen der Richtlinie über In Vitro Diagnostica 98/79/EG.	SMP PREP DIL SPE	Sample Preparation Apparatus containing Sample Diluent / Dispositivo per la preparazione del campione contenente il diluente del campione / Système pour la préparation de l'échantillon, diluant inclus / Aparato para Preparación de Muestra con Diluyente de Muestra / System zur Probenvorbereitung, in dem sich Probenverdünngspuffer befindet
REF	Catalogue number / Numero di 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 / Consulte las instrucciones de uso / Gebrauchsanweisung beachten	BUF RXN	Reaction Buffer / Tampone di reazione / Solution de réaction tamponnée / Tampón de Reacción / Reaktionspuffer
	Manufacturer / Fabbricante / Fabricant / Fabricante / Hersteller		For IVD Performance Evaluation Only / Soltanto per valutazione delle prestazioni / Réactifs IVD reserves à l'évaluation des performances / Sólo para evaluación del funcionamiento / Nur zur IVD Leistungsbewertung
Σ	Contains sufficient for <n> tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / 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 / Límite de temperatura / Temperaturbegrenzung	CONJ ENZ	Enzyme Conjugate / Coniugato enzimatico / Conjugué enzymatique / Conjugado enzimático / Enzymkonjugat
SN	Serial number / Numero di serie / Numéro de série / Número de serie / Seriennummer	CONTROL	Assay Control / Controllo del test / Test de contrôle / Control de Ensayo / Kontrolltest
TEST	Test Device / Dispositivo test / Dispositif de test / Dispositivo de Prueba / Testgerät	REAG	Reagent / Reagente / Réactifs / Reactivos / Reagenzien
	Date of manufacture / Data di fabbricazione / Date de fabrication / Fecha de fabricación / Herstellungsdatum	BUF WASH	Wash Buffer / Soluzione di lavaggio / Solution de lavage / Tampón de lavado / Waschpuffer
BUF	Buffer / Soluzione tampone/ Solution tamponnée / Tampón / Puffer		Warning / Avvertenze / Mise En Garde / Advertencia / Warnhinweise
CONJ	Conjugate / Coniugato / Conjugué / Conjugado / Konjugat	DIL SPE	Specimen Diluent (or Sample Diluent) / Diluente del Campione / Diluant 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
		DET REAG	Detection Reagent / Reagente Diretto / Réactif de Detection / Reactivo de Detección / Nachweis Reagenz

For technical assistance, call Technical Support Services at (800) 343-3858 between the hours of 8AM and 6PM, USA Eastern Standard Time. To place an order, call Customer Service Department at (800) 543-1980.