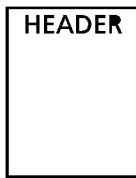


Revisions

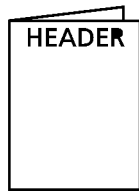
Rev from	Rev to	ECO #
2010/07	2010/11	5574-10

Notes:

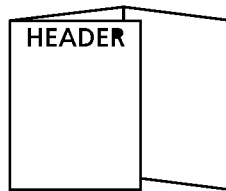
1. BD Cat. Number 252360
2. Blank (Sheet) Size: Length: 8.5" Width: 11"
 Number of Pages: 36 Number of Sheets: 9
 Page Size: Length 8.5" Width 5.5" Final Folded Size: N/A
3. Style (see illustrations below): # 5



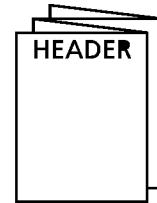
#1



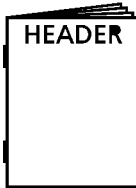
#2



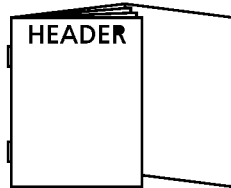
#3



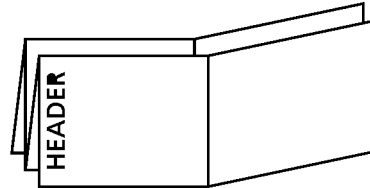
#4



#5



#6



#7

4. See Specification Control Number BALT0214011 for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides Yes No
 No. of Colors: 1 PMS# 2755 (Blue)
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level

Label Design	Date	COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION	BD Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA	
Proofer	Date			
Checked By	Date			
Part Number: 0214011JAA		Category and Description Package Insert, Directigen Meningitis Combo Test	Sheet: 1 of 37 <hr/> Scale: N/A	A

BD Directigen™ Meningitis Combo Test

For the detection of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, group B *Streptococcus* and *Neisseria meningitidis* groups A, B, C, Y and W135.

English: pages 1 – 5 Italiano: pagine 15 – 19
Français : pages 6 – 10 Português páginas 19 – 23
Deutsch: Seiten 10 – 14 Español: páginas 24 – 28



0214011JAA
2010/11

Pokyny vám poskytne miestni zástupce spoločnosti BD. / Kontakt den lokale BD repræsentant for at få instruktioner. / Kasutusjuhiste suhtes kontakteeruge oma kohaliku BD esindajaga. / Επικοινωνήστε με τον τοπικό αντιπρόσωπο της BD για οδηγίες. / A használati utasítást kérje a BD helyi képviselőjétől. / Naudojimo instrukcijų teiraukitės vietos BD įgaliotojo atstovo. / Kontakt din lokale BD-representant for mer informasjon. / Aby uzyskać instrukcje użytkowania, skontaktuj się z lokalnym przedstawicielstwem BD. / Contacte o seu representante local da BD para obter instruções. / Instrukcije ziskate u miestneho zástupcu spoločnosti BD. / Kontakta lokal Becton Dickinson-representant for anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danışın. / Обратитесь к своему локальному представителю компании BD за инструкциями. / Для получения инструкции свяжитесь с местным представителем компании BD. / Өзіндік жергілікті BD өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

INTENDED USE

The **Directigen™** Meningitis Combo Test is a presumptive latex agglutination test for the direct qualitative detection of antigens to *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* groups A, B, C, Y or W135 and *Escherichia coli* K1 in cerebrospinal fluid (CSF), serum or urine. The test can also be used for the direct qualitative detection of antigens to group B *Streptococcus* in CSF and serum. In addition, the test kit provides confirmation and serogrouping capabilities from suspected colonies of *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, group B *Streptococcus*, and *N. meningitidis* groups A / Y, B or C / W135. Visible agglutination occurs when a sample containing any of these bacterial antigens is reacted with its respective antibody-coated latex beads.

SUMMARY AND EXPLANATION

The diagnosis of bacteremia and meningitis, especially in young children, can be difficult. As many as 55% of children are seen by a physician and started on antibiotics before meningitis is detected.¹ Detection of microbial antigens in the CSF is a rapid and helpful method for diagnostic microbiology. It may be the single most important test in cases of partially treated meningitis since Gram stain and culture may be negative. Detection of a specific antigen is a clinically significant finding and a valuable aid when choosing antimicrobial therapy.²

Haemophilus influenzae type b, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae* have been reported to be the three causative agents responsible for approximately 84% of cases of bacterial meningitis.³

Group B *Streptococcus* and *Escherichia coli* K1 are major bacterial pathogens in the newborn.⁴⁻⁷ Strains of group B-streptococci and *E. coli* K1 frequently colonize in the vagina and/or rectum and may be associated with maternal septicemia and neonatal septicemia, pneumonia and meningitis.⁸ The *E. coli* K1 polysaccharide antigen has been shown to be structurally and immunologically similar to *Neisseria meningitidis* group B antigen.^{9,10} The **Directigen *Neisseria meningitidis* group B Latex Reagent** does not differentiate the two antigens, but can be useful in the diagnosis of neonatal *E. coli* K1 meningitis. The high morbidity and mortality associated with group B streptococci and *E. coli* K1 in newborns make rapid, accurate identification of these organisms extremely important.⁴

Immunological methods for detecting characteristic exoantigens of pathogenic microorganisms in patient fluids (CSF, serum, urine) are typically faster than traditional methods such as culture. These techniques include counterimmunoelectrophoresis (CIE) and latex agglutination.¹¹⁻¹⁴ The latex agglutination procedure has been found to be more rapid and sensitive than CIE in the detection of purified antigen.¹⁵⁻¹⁷

PRINCIPLES OF THE PROCEDURE

Specific antibodies are bound to the surface of latex beads. Latex particle aggregation becomes large enough to allow rapid visualization of positive agglutination in the presence of specific antigens. These specific soluble polysaccharide antigens accumulate in CSF, serum or urine as a result of infection by *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, and *N. meningitidis* groups A, B, C, Y or W135 and *Escherichia coli* K1; and in CSF and/or serum, as a result of infection by group B *Streptococcus*. All of these antigens can be detected with the **Directigen Meningitis Combo Test Kit**.

REAGENTS

Directigen Meningitis Combo Kit:

Reagent 1	(1.0 mL),	Anti- <i>H. influenzae</i> type b, Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
Reagent 2	(1.0 mL),	Anti- <i>S. pneumoniae</i> , Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
Reagent 3	(1.0 mL),	Anti-group B <i>Streptococcus</i> , Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
Reagent 4	(1.0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> groups C and W135, Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
Reagent 5	(1.0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> groups A and Y, Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
Reagent 6	(1.0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1, Mouse Monoclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
Reagent A	(0.5 mL),	Control Latex, Rabbit Immunoglobulin-Coated Latex Suspension,
Reagent B	(0.5 mL),	Control Latex, Mouse Immunoglobulin-Coated Latex Suspension, each of the above with 0.2% sodium azide (preservative),
Control +	(9.0 mL),	Polyvalent Positive Antigen Control, <i>H. influenzae</i> type b, <i>S. pneumoniae</i> , group B <i>Streptococcus</i> and <i>N. meningitidis</i> groups A, B, C, Y and W135 antigens,
Control –	(9.0 mL),	Negative Antigen Control, glycine buffered saline, each of the above with 0.2% sodium azide (preservative),
Specimen Buffer	(8.0 mL),	Specimen Buffer Solution, containing EDTA.

Precautions: For *in vitro* Diagnostic Use.

Warning: Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions"¹⁸⁻²¹ and institutional guidelines should be followed in handling all items contaminated with blood and other body fluids. Prior to discarding, sterilize specimen containers and other contaminated materials by autoclaving.

Reagents: Do not use beyond the expiration date. Upon removal from refrigeration, allow reagents to warm to room temperature (15 – 30°C) before use.

To assure proper drop delivery, reagent dispensing bottle must be held vertically, dispensing one free-falling drop at a time.

Warning: Reagents contain sodium azide, which is very toxic by inhalation, in contact with skin, and if swallowed. Contact with acids liberates very toxic gas. After contact with skin, wash immediately with plenty of water. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.

Controls: Do not use the kit if **Control +** and **Control –** do not yield appropriate results.

Test Cards: Cards must be flat for proper reactions. If necessary, flatten cards by bowing back in a direction opposite to that of the curl. Care should be taken not to finger-mark test areas, since this may result in an oily deposit and improper test results. Use each card once and discard. Store cards in original package in a dry area at room temperature. When spreading within confines of test areas, avoid scratching card surface with plastic stirrer. If specimen does not spread to outer perimeter of test area, use another test area of the card.

Test Slide (Glass): If the glass slide is used, disinfect the slide after each use, and wash before reuse. A phenolic disinfectant is suggested. Be sure all detergent and/or disinfectants are thoroughly rinsed from the slide before reuse.

Rotation: The recommended speed for mechanical rotation is 100 ± 2 rpm, but rotation between 95 and 110 rpm does not significantly affect the results obtained. The rotator should circumscribe a circle approximately 2 cm in diameter in the horizontal plane. A moistened humidifying cover should be used to prevent drying of test specimens during rotation.

Storage of Reagents: Upon receipt, remove carton containing reagents and refrigerate at 2 – 8°C. DO NOT FREEZE. Reagents should be recapped and returned to refrigeration when not in use, taking care not to mix color-coded caps.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Refer to appropriate texts for details of specimen collection and handling procedures. Specimens should be tested as soon as possible; however, if the sample cannot be tested immediately, it should be stored at 2 – 8°C (for up to 48 h), or at -20°C. Serum must be separated from whole blood prior to testing or storage.

SPECIMEN PRETREATMENT

The use of covered glass test tubes (borosilicate) in a 100°C (boiling) water bath is the most effective means of specimen treatment. Although glass test tubes in a heat block may be used, greater variation in the thorough heating of a sample may be noted as a result of variations in tube size and sample volume.

PROCEDURES

The testing area, reagents, test specimens and test components should be at room temperature (15 – 30°C) when used.

Materials Provided: All materials as listed under "Reagents," work station, disposable test cards and accessories.

Materials Required But Not Provided: Rotator, humidifying cover, micropipettor (50 µL delivery) and pipette tips (see "Availability").

Also required are the necessary equipment and labware used for preparation, storage and handling of CSF, serum and urine specimens.

Specimen Preparation (CSF):

1. Heat specimens for 3 min at 100°C (e.g., water bath or heat block) and allow to cool to room temperature before use. For optimal sensitivity, *N. meningitidis* group B and *E. coli* K1 testing should be performed on unheated specimens (see "Limitations of the Procedure").
2. For CSF specimens showing turbidity, centrifuge after heating for 10 min at 1400 x g prior to testing. The supernatant fluid is to be used as the test specimen.
3. Test specimens as described in "Test Procedure."

Specimen Preparation (Serum):

1. Dilute serum specimens of at least 0.6 mL 1:1 with **Directigen** Specimen Buffer and mix.
2. Heat specimens for 5 min at 100°C (e.g., water bath or heat block) and allow to cool to room temperature before use.
3. Using a wooden applicator stick, break up the protein "clot" formed, and vortex vigorously (approximately 5 sec).
4. Centrifuge at a minimum of 1400 x g for 15 min.
5. Test supernatant fluid as described in "Test Procedure."

Specimen Preparation (Unconcentrated Urine):

1. Dilute urine specimens of at least 0.4 mL 1:1 with **Directigen** Specimen Buffer and mix.
2. Heat specimens for 5 min at 100°C (e.g., water bath or heat block) and allow to cool to room temperature before use.
3. Centrifuge at a minimum of 1400 x g for 10 min.
4. Test supernatant fluid as described in "Test Procedure."

Specimen Preparation (Concentrated Urine):

1. Urine samples that are turbid or have particulate material should be centrifuged at 1400 x g for 10 min before concentrating.
2. Urine samples may be concentrated 25-fold with a Minicon B-15 concentrator (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts).
3. Dilute at least 200 µL of urine concentrate 1:1 with **Directigen** Specimen Buffer and mix.
4. Heat specimens for 5 min at 100°C (e.g., water bath or heat block) and allow to cool to room temperature before use.
5. Centrifuge at a minimum of 1400 x g for 10 min.
6. Test supernatant fluid as described in "Test Procedure."

Preparation for Confirmation of Colonies from Culture:

1. Locate suspected colonies on the agar surface from 18 – 24 h cultures that meet morphological and Gram stain characteristics of organisms that are appropriate for testing with **Directigen Meningitis** latex reagents. **Note:** A Gram stain should be performed prior to testing to ensure that organisms are appropriate for testing with the **Directigen Meningitis** latex reagents.
2. Pipette 0.5 mL (approximately 10 drops) of Control – reagent into a small glass test tube (10 x 75 mm or equivalent).
3. Select several (2 – 3) isolated colonies of similar morphology from the original or subculture plate using a sterile loop and suspend into the above tube to achieve a suspension equal to a McFarland #1 turbidity standard. **Note:** Over inoculating will yield an excessively heavy suspension which may cause erroneous results.
4. Heat the suspension for 3 min at 100°C (e.g., boiling water bath or heat block) and allow to cool to room temperature before testing.
5. Centrifuge at minimum of 1400 x g for 10 min.
6. Test supernatant as described under “Test Procedure.” **Note:** If atypical agglutination patterns are observed, refer to “Limitations of the Procedure.”

User Quality Control:

Include **Control +** and **Control –** testing with each batch of specimens tested as described in step 1, “Test Procedure.”

Quality control requirements must be performed in accordance with applicable local, state and/or federal regulations or accreditation requirements and your laboratory's standard Quality Control procedures. It is recommended that the user refer to pertinent CLSI (formerly NCCLS) guidance and CLIA regulations for appropriate Quality Control practices.

Test Procedure (CSF, serum, urine, concentrated urine, and colony confirmation):

Remove reagents from refrigerated storage, and place reagents and card in designated wells of Work Station Tray.

Use only the test card or glass slide recommended for this kit. Before use of the glass slide, thoroughly clean with a lint-free tissue.

Refer to Procedural Chart Illustration, page 32.

1. Dispense one drop of **Control +** onto circles 1 through 6 of row “+”. Place one drop of **Control –** onto circles 1 through 6 of row “-”.
2. Micropipette 50 µL of test sample onto circles 1 through 6, row “S” (Sample) and in circles labelled “A” and “B”. Rows “+” (Positive) and “-” (Negative) are used for controls. Subsequent sample testing can be done using rows +, – and S of new test cards.
3. Holding the dispensing bottle by the cap, vigorously swing (without inverting) to thoroughly mix **Reagents 1 – 6** and **Reagents A** and **B**. Before uncapping each bottle, gently tap base on counter top to assure no latex reagent remains in the tip.
4. Dispense one drop of **Reagent A** (Control Latex Suspension) onto the “A” circle.
Repeat the procedure dispensing one drop of **Reagent B** (Control Latex Suspension) onto the “B” circle.
5. Dispense one drop of Latex Suspension **Reagent 1** onto the circles in column 1, rows “+” (Positive), “-” (Negative) and “S” (Sample).
Repeat the procedure for the remaining Latex Suspensions (**Reagents 2 – 6**) in rows “+”, “-” and “S”, columns 2 through 6.
6. Mix the samples and Latex reagents in each circle with a plastic stirrer, alternately using first one end, and then the opposite end for the next circle. Discard the stirrer.
7. Place the card or glass slide on a mechanical rotator and rotate at a speed of 100 ± 2 rpm for 10 min. Use a moistened humidifying cover to prevent evaporation.
8. Immediately at the end of 10 min, read the test results macroscopically under a high intensity incandescent light.

Note: For testing a specimen (CSF, serum, urine, concentrated urine, or colony confirmation) with one individual **Reagent 1 – 5**, **Reagent A** must be used. For testing with one individual **Reagent 6**, **Reagent B** must be used. Use the above procedure.

INTERPRETATION OF TEST RESULTS

Record **Control +** and **Control –** test results first: The **Control +** should yield strong agglutination in circles of row “+” within 10 min. The **Control –** should show no agglutination in circles of row “-”. Agglutination in any of the circles containing **Control –** renders the reaction uninterpretable.

Record sample test results:

Positive Test – Should show agglutination. Any degree of agglutination present in one of the latex reagents indicates the presence of the corresponding antigen. *Agglutination in two or more latex reagents or the corresponding **Reagent A (Reagents 1 – 5)** or **Reagent B (Reagent 6)** renders the reaction uninterpretable.*

Negative Test – Should show no agglutination.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

These latex agglutination tests are not intended as a substitute for bacterial culture. Confirmatory diagnosis of bacterial meningitis infection is only possible with appropriate culture procedures.

Samples with extremely low levels of antigen, for instance early in the course of infection, may yield false negative results. Furthermore, samples with exceedingly high antigen concentrations may exhibit prozone effects producing inappropriately negative results. Although not extensively studied, prozone phenomena have only been observed in specimens seeded with extremely high antigen levels, and not in clinical specimens.

This assay is for the qualitative detection of antigens to *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* groups A, B, C, Y or W135 and *E. coli* K1 in CSF, serum or urine; and to group B *Streptococcus* in CSF and serum. In addition, the test kit can also be used with suspected colonies of *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, group B *Streptococcus*, and *N. meningitidis* groups A, B, C, Y or W135. Performance with other specimen types has not been assessed.

The **Directigen Meningitis Combo Test** cannot be used with blood culture media.

A positive or negative group B streptococcal result is only indicative of the presence or absence of group B streptococcal antigen and is not diagnostic for the presence or absence of group B streptococcal disease.

This device should not be used as a substitute for bacterial culture in the diagnosis of group B streptococcal septicemia and/or meningitis.

A positive or negative result is a presumptive result for group B streptococcal antigen. The result must be confirmed by culture.

The only *infant* specimens recommended for the direct qualitative detection of group B streptococcal antigen are serum and cerebrospinal fluid. Testing infant urine with devices for direct qualitative detection of group B streptococcal antigen cannot be recommended at this time; currently there is insufficient performance data supporting the use of this test on urine as a reliable predictor of group B streptococcal disease.

Pneumococcal and *Haemophilus influenzae* type b strains not possessing a capsular antigen may not be detected by immunological techniques.

Cross-reactions of *H. influenzae* reagent are known to occur in the presence of *Escherichia coli* K100. *N. meningitidis* groups C and W135 reagent is known to cross react in the presence of *Escherichia coli* K92. Other cross-reactions, uninterpretable and false positives may occur which are reduced or eliminated by proper specimen preparation (see "Specimen Pretreatment" and "Procedures-Specimen Preparation").

Studies with CSF specimens seeded with *N. meningitidis* group B and *E. coli* K1 antigen have suggested that some loss in sensitivity may result after heating as compared to unheated samples.

Untreated serum and urines may yield uninterpretable results with the latex reagents and should be treated as in "Procedures-Specimen Preparation." CSF specimens showing turbidity should be centrifuged for 10 min at 1400 x g or after heating, and prior to testing. The supernatant fluid is to be used as the test specimen.

Urine specimens processed according to "Procedures-Specimen Preparation" that yield uninterpretable or suspected false positive results may be filtered using a MILLIPORE™ Millex-HA 0.45 µm filter (#SLHA-0250S) and retested with the reactive test latex(es) and the corresponding control latex(es).

Colony confirmation samples that yield uninterpretable or atypical agglutination reactions may require a 1:10 dilution of the supernatant with Control – reagent. Care should be taken to avoid bacterial suspensions greater than a McFarland #1 turbidity standard.

Latex agglutination tests of urine have potential usefulness in providing supportive evidence for the presence of pathogenic organisms in infants presenting with fever without localizing signs.²² However, the excretion of urinary antigen may persist in infants for 3 – 14 days, or up to 30 days, following the administration of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) vaccines. Frequency and duration of antigenuria depends on the patient and the type of vaccine given. Patient vaccination history is important for the correct interpretation of positive urinary Hib antigen results in vaccinated infants.²²⁻²⁴

Cross-reactions have been produced by some strains of the viridans streptococci group (i.e. *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)²⁵ with the **Directigen** *S. pneumoniae* latex reagent. Additional tests may be needed to differentiate the viridans streptococci group from *S. pneumoniae*.

A Gram stain should be performed prior to use with the colony confirmation procedure. Certain bacterial isolates obtained from blood culture plates which are morphologically similar to, but Gram stain inconsistent with the suspect colony, may exhibit non-specific agglutination and/or false positive reactions (i.e. beta-hemolytic nonpathogenic *Neisseria* species) with the group B Strep latex.

EXPECTED VALUES

Haemophilus influenzae type b, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae* have been reported to be the three causative agents responsible for approximately 84% of cases of bacterial meningitis.³

Group B *Streptococcus* and *Escherichia coli* K1 are major bacterial pathogens in the newborn.⁴⁻⁷ Strains of group B streptococci and *E. coli* K1 frequently colonize in the vagina and/or rectum and may be associated with maternal septicemia and neonatal septicemia, pneumonia and meningitis.⁸

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity: In a series of retrospective clinical evaluations, cerebrospinal fluids (heated and unheated), serum and urine specimens were tested by the **Directigen** Meningitis latex reagents. The specimens tested were originally derived from patients with culture, CIE or commercial latex reagent positive confirmed cases of either *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* groups A, B, C, W135 or group B streptococcal infection. The latex results were also compared to counterimmunoelectrophoresis (CIE) but, not all samples were tested with CIE (**Table 1 see pg. 29**). The **Directigen** Meningitis latex reagents were equal to, or more sensitive than CIE in detecting antigen in CSF, serum and urine specimens.

E. coli K1 sensitivity was determined by using whole cell *E. coli* K1 seeded into body fluids and compared to commercially available latex agglutination reagent. The **Directigen** *N. meningitidis* group B Latex Reagent could detect *E. coli* K1 in CSF (4/4), urine (4/4), urine (3/4) and concentrated urine (4/4). The endpoint sensitivities were equal to or better than those observed with a similar commercially available latex reagent.¹⁵

Each **Directigen** latex reagent was also compared with CIE for its ability to detect partially purified antigen seeded in CSF, serum, urine and concentrated urine. Commercial antiserum specific for each antigen was used in the CIE test. The **Directigen** latex reagents were more sensitive than CIE.¹⁵

Specificity: The specificity of the **Directigen** Meningitis reagents was determined by testing retrospective and prospective CSF, serum, urine and concentrated urine specimens in multiple clinical studies (**Table 2 see pg. 30**). Both culture negative and nonindexed culture positive specimens were tested. The data indicates specificity ranges of 97-100% depending on the latex and specimen tested.

Colony Confirmation: Latex reagents were tested using suspensions of isolated colonies that met morphological characteristics of the organisms. Performance characteristics are listed in **Table 3 (see pg. 31)**.

AVAILABILITY

Cat. No.	Description
252360	Directigen™ Meningitis Combo Test, (30 patients tests, 60 Controls)
255460	Directigen™ Group B Strep Test, (30 patient tests, 60 controls).
252260	Directigen™ <i>H. influenzae</i> type b Test, (30 patient tests, 60 controls).
255560	Directigen™ <i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1 Test, (30 patient tests, 60 controls).
250160	Directigen™ <i>N. meningitidis</i> groups A, C, Y and W135 Test, (30 patient tests, 60 controls).
251960	Directigen™ <i>S. pneumoniae</i> Test, (30 patient tests, 60 controls).
256391	Directigen™ Specimen Buffer, 8 mL.
252350	Directigen™ Meningitis Negative Control Reagent, 9 mL, Box 4.
278051	Macro-Vue™ Card Test Rotator (with humidifying cover), 100 ± 2 rpm, automatic timer, friction drive, Model 51-11 (110 V).
252480	Directigen™ Meningitis Combo Test Card (single use), Box 30.

REFERENCES

1. Rothrock, S.G., S.M. Green, J. Wren, D. Letai, L. Daniel-Underwood, E. Pillar: Pediatric bacterial meningitis: is prior antibiotic therapy associated with unaltered clinical presentation?, *Annals Emerg. Med.* 21:146-152, 1992.
2. Fasola, E. and P. Ferrieri: Laboratory diagnostic methods for central nervous system infections, *Neuro. Clinics N. Amer.* 3:279-290, 1992.
3. Morbidity and Mortality Weekly Report (CDC), Surveillance summary: bacterial meningitis and meningococemia, United States, 28:277-279, 1978.
4. Finegold, S.M. and Martin, W.J.: *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, Sixth Ed., C.V. Mosby Co., 1982.
5. Baker, C.J.: Summary of the workshop on perinatal infections due to group B *Streptococcus*, NIH News, *J. Infect. Dis.*, 136:137-152, 1977.
6. Mulder, C.J.J., Van Alphen, L. and Zanen, H.C.: Neonatal meningitis caused by *Escherichia coli* in the Netherlands, *J. Infect. Dis.*, 150:935, 1984.
7. Sarff, L.D., McCracken, G.H., Jr., Schiffer, M.S., Glöck, M.P., Robbins, J.B. and Orskov, F.: Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns, *Lancet*, 7:1099-1104, 1975.
8. Blaunstein, H., Tucker, E.B., and Gibson, B.C.: Identification and significance of *Streptococcus agalactiae*, *Am. J. Clin. Path.*, 57:207-213, 1969.
9. Kasper, D.L., Winkelhake, J.L., Zollinger, W.D., Brandt, B.L. and Artenstein, M.S.: Immunochemical similarity between polysaccharide antigens of *Escherichia coli*: 07:K1 (L): NM and group B *Neisseria meningitidis*, *J. Immunol.*, 110:262-268, 1973.
10. Lifely, M.R., Gilbert, A.S. and Moreno, C.: Sialic Acid polysaccharide antigens of *Neisseria meningitidis* and *Escherichia coli*: esterification between adjacent residues, *Carbohydr. Res.*, 94:193-203, 1981.
11. Edwards, E.A.: Immunologic investigations of meningococcal disease, group-specific *Neisseria meningitidis* antigens present in the serum of patients with fulminant meningococemia, *J. Immunol.* 106:314-317, 1971.
12. Whittle, H.C., Egler, J.J., Tugwell, P. and Greenwood, B.M.: Rapid bacteriological diagnosis of pyogenic meningitis by latex agglutination, *Lancet*, 2:619-621, 1974.
13. Ingram, D.L., Anderson, P. and Smith, D.H.: Counter-current immunoelectrophoresis in the diagnosis of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b, *J. Ped.*, 87:1156-1159, 1972.
14. Newman, R.B., Stevens, R.W. and Gaafar, H.H.: Latex agglutination test for the diagnosis of *Haemophilus influenzae* meningitis, *J. Lab. Clin. Med.*, 76:107-113, 1970.
15. Data on file at BD Diagnostic Systems.
16. Tilton, R.C., Dias, F. and Ryan, R.W.: Comparative evaluation of three commercial products and counter-immunoelectrophoresis for the detection of antigens in cerebrospinal fluid, *J. Clin. Microbiol.*, 20:231-234, 1984.
17. Rench, M.A., Metzger, T.G. and Baker, C.J.: Detection of group B streptococcal antigen in body fluids by a latex-coupled monoclonal antibody assay, *J. Clin. Microbiol.*, 20:852-854, 1984.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Approved Guideline M29-A3. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 3rd ed. CLSI, Wayne, Pa.
19. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control Hospital Epidemiol.* 17:53-80.
20. U.S. Department of Health and Human Services. 2007. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 5th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
21. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). *Official Journal L262*, 17/10/2000, p. 0021-0045.
22. Jones, R.G., Bass, J.W., Weisse, M.E., and Vincent, J.M. Antigenuria after immunization with *Haemophilus influenzae* oligosaccharide CRM197 conjugate (HbOC) vaccine. *Pediatr. Inf. Dis. J.* 1991; 10:557-559.
23. Goepff, J.G., Hohenboken, M., Almeida-Hill, J., and Santocham, M. Persistent urinary antigen excretion to infants vaccinated with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide conjugated with outer membrane protein from *Neisseria meningitidis*. *Pediatr. Inf. Dis. J.* 1992; 11:2-5.
24. Rothstein, E.P., Madore, D.V., et. al. Comparison of antigenuria after immunization with three *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Pediatr. Inf. Dis. J.* 1991; 10:311-314.
25. Holmberg, H., Danielsson, D., Hardie, J., Krook, A., Whiley, R.: Cross-reactions between α -streptococci and omniserum, a polyvalent pneumococcal serum, demonstrated by direct immunofluorescence, immunoelectroosmophoresis, and latex agglutination, *J. Clin. Microbiol.*, 21:745-748, 1985.



BD Directigen Meningitis Combo Test

Pour la détection de *H. influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, *Streptococcus* groupe B et *Neisseria meningitidis* groupes A, B, C, Y et W135.

Français

APPLICATION

Le test Meningitis Combo **Directigen** est un test de présomption utilisant une technique d'agglutination de particules de latex pour la détection qualitative directe d'antigènes de *H. influenzae* de type b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* des groupes A, B, C, Y ou W135 et *Escherichia coli* K1, dans le liquide céphalorachidien (LCR), le sérum ou l'urine. Le test peut également être utilisé pour le dosage qualitatif direct des antigènes de *Streptococcus* du groupe B dans le LCR et le sérum. De plus, la trousses diagnostique permet de confirmer la présence et le sérogroupes des colonies présumées de *H. influenzae* de type b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* du groupe B et *N. meningitidis* des groupes A / Y, B ou C / W135. Une agglutination visible est observée lorsqu'un échantillon contenant l'un de ces antigènes bactériens est mis en présence de billes de latex recouvertes de l'anticorps correspondant.

RESUME ET EXPLICATION

Le diagnostic de la bactériémie et de la méningite, en particulier chez le jeune enfant, peut être difficile. Jusqu'à 55 % des enfants examinés par un médecin sont placés sous antibiothérapie avant qu'une méningite soit diagnostiquée.¹ La détection d'antigènes microbiens dans le LCR est une méthode rapide et utile pour le diagnostic microbiologique. Il peut s'agir du test unique le plus important en cas de méningite partiellement traitée, car la coloration de Gram et la mise en culture peuvent être négatives. La détection d'antigènes spécifiques est une donnée clinique importante fournissant une information précieuse pour faciliter le choix d'un traitement antimicrobien.²

Haemophilus influenzae de type b, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae* sont responsables d'environ 84 % des cas de méningites bactériennes.³

Streptococcus de groupe B et *Escherichia coli* K1 sont les principaux agents pathogènes bactériens chez le nouveau-né.⁴⁻⁷ Des souches de streptocoques du groupe B et *E. coli* K1 colonisent souvent le vagin et/ou le rectum et peuvent aussi être responsables de septicémies chez la mère et, chez le nouveau-né, de septicémies, de pneumonies et de méningites.⁸ Il a été démontré que l'antigène polysaccharidique du *E. coli* K1 est structurellement et immunologiquement similaire à celui de *Neisseria meningitidis* du groupe B.^{9,10} Le réactif au latex **Directigen** pour *Neisseria meningitidis* du groupe B ne différencie pas les deux types d'antigènes, mais il peut être utile au diagnostic de méningite néonatale à *E. coli* K1. La morbidité et la mortalité néonatales associées aux streptocoques du groupe B et à *E. coli* K1 étant élevées, une identification rapide et précise de ces microorganismes est extrêmement importante.⁴

Les méthodes immunologiques de détection d'antigènes exogènes, caractéristiques de microorganismes pathogènes dans les liquides organiques d'un patient (LCR, sérum, urine), sont habituellement plus rapides que les méthodes traditionnelles comme la mise en culture. Ces techniques comprennent l'électrosynérèse (CIE) et l'agglutination de particules de latex.¹¹⁻¹⁴ La méthode d'agglutination de latex s'est avérée plus rapide et plus sensible que la CIE pour la détection d'un antigène purifié.¹⁵⁻¹⁷

PRINCIPES DE LA METHODE

Des anticorps spécifiques sont liés à la surface de billes de latex. L'agrégation des particules de latex devient suffisamment importante pour permettre la visualisation d'une agglutination positive en présence d'antigènes spécifiques. Ces antigènes polysaccharidiques solubles spécifiques s'accumulent dans le LCR, le sérum ou l'urine à la suite d'une infection par *H. influenzae* de type b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* des groupes A, B, C, Y ou W135 et *Escherichia coli* K1; et, dans le LCR et/ou le sérum, à la suite d'une infection à *Streptococcus* de groupe B. Tous ces antigènes peuvent être détectés avec la trousses diagnostique Meningitis Combo **Directigen**.

REACTIFS

Trousses Meningitis Combo **Directigen** :

Réactif 1	(1,0 mL),	Anti- <i>H. influenzae</i> de type b, suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin,
Réactif 2	(1,0 mL),	Anti- <i>S. pneumoniae</i> , suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin,
Réactif 3	(1,0 mL),	Anti- <i>Streptococcus</i> du groupe B, suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin,
Réactif 4	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> des groupes C et W135, suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin,
Réactif 5	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> des groupes A et Y, suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin,
Réactif 6	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> du groupe B et anti- <i>E. coli</i> K1, suspension de latex recouvert d'anticorps monoclonaux de souris,
Réactif A	(0,5 mL),	Latex de contrôle, suspension de latex recouvert d'immunoglobulines de lapin,
Réactif B	(0,5 mL),	Latex de contrôle, suspension de latex recouvert d'immunoglobulines de souris – chaque réactif contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur),
Contrôle +	(9,0 mL),	Contrôle antigène positif polyvalent, antigènes de <i>H. influenzae</i> de type b, <i>S. pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> de groupe B et <i>N. meningitidis</i> des groupes A, B, C, Y et W135,
Contrôle –	(9,0 mL),	Contrôle antigène négatif, sérum physiologique tamponné à la glycine – chaque contrôle contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur),
Tampon pour échantillon	(8,0 mL),	Solution tampon pour échantillons, contient de l'EDTA.

Précautions : Réservé au diagnostic *in vitro*.

Avertissement : Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »¹⁸⁻²¹ et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Stériliser à l'autoclave les récipients contenant les échantillons et d'autres matériaux contaminés avant de les éliminer.

Réactifs : Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption. Après avoir sorti les réactifs du réfrigérateur, les laisser se réchauffer à température ambiante (15 – 30 °C) avant de les utiliser.

Pour garantir une distribution en gouttes de taille correcte, les flacons distributeurs de réactifs doivent être maintenus verticalement, de manière à ne distribuer qu'une goutte à la fois.

Avertissement : Les réactifs contiennent de l'azide de sodium, qui est extrêmement toxique par inhalation, contact avec la peau ou ingestion. Au contact d'un acide, un gaz très toxique est dégagé. Éviter tout contact avec la peau ; laver immédiatement à grande eau. L'azide de sodium peut réagir au contact du plomb ou du cuivre des canalisations et former des azides métalliques très explosifs. Rincer avec un grand volume d'eau lors de l'élimination pour éviter l'accumulation d'azides.

Contrôles : Ne pas utiliser la trousse si le **contrôle +** et le **contrôle -** ne donnent pas les résultats escomptés.

Cartes de test : Les cartes doivent être bien plates pour donner des réactions correctes. Si nécessaire les aplatir en les faisant bomber dans le sens inverse de l'incurvation. Bien veiller à ne pas laisser d'empreintes de doigts sur les zones de test, car tout dépôt gras risque de fausser les résultats. Utiliser chaque carte une seule fois, puis la jeter. Conserver les cartes neuves dans leur emballage d'origine, à l'abri de l'humidité et à température ambiante. Lors de l'étalage aux confins des zones de test, éviter de gratter la surface de la carte avec l'agitateur en plastique. Si l'échantillon ne s'étale pas jusqu'au périmètre extérieur de la zone de test, utiliser une autre zone de test de la carte.

Lame de test (en verre) : Si une lame en verre est utilisée, désinfecter la lame après chaque utilisation et la laver avant réutilisation. L'emploi d'un désinfectant à base de phénol est recommandé. Veiller à éliminer complètement par rinçage les détergents et/ou les désinfectants présents sur la lame avant de la réutiliser.

Agitation rotative : La vitesse d'agitation rotative mécanique recommandée est de 100 ± 2 rpm, mais une vitesse allant de 95 à 110 tr/min n'affecte pas les résultats obtenus de façon significative. L'agitateur rotatif doit décrire un cercle de 2 cm de diamètre environ dans le plan horizontal. Utiliser un couvercle d'humidification humecté pour éviter la dessiccation des échantillons testés pendant l'agitation.

Conservation des réactifs : Dès réception, sortir le carton contenant les réactifs et les réfrigérer à une température comprise entre 2 et 8 °C. NE PAS CONGELER. Après utilisation, reboucher les réactifs et les remettre au réfrigérateur en veillant à ne pas permuter les bouchons à code de couleur.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Se reporter aux textes concernés pour plus d'informations sur les procédures de prélèvement et de manipulation des échantillons. Tester les échantillons dès que possible ; toutefois, s'il est impossible de tester un échantillon immédiatement, le conserver à une température comprise entre 2 et 8 °C (48 h au maximum) ou le congeler à -20 °C.

Séparer le sérum du sang total avant de le tester ou de le stocker.

PRETRAITEMENT DES ECHANTILLONS

L'utilisation de tubes à essai en verre (borosilicaté) bouchés dans un bain-marie à 100 °C (bain-marie à ébullition) est le moyen le plus efficace de traiter les échantillons. Même s'il est possible d'utiliser un bloc chauffant pour des tubes à essai en verre, les variations de taille de tube et de volume d'échantillon pourraient entraîner des variations plus importantes de chauffage intégral d'un échantillon.

MODES OPERATOIRES

Lors du test, le plan de travail, les réactifs, les échantillons et les composants du test doivent se trouver à température ambiante (15 – 30 °C).

Matériel fourni : Le matériel fourni est répertorié au paragraphe « Réactifs » ; poste de travail, cartes de test jetables et accessoires.

Matériel requis mais non fourni : Agitateur, couvercle humidificateur, micropipette de 50 µL, embouts de pipette (voir « Matériel disponible »).

Sont également requis, le matériel et les fournitures de laboratoire utilisés pour la préparation, la conservation et la manipulation des échantillons de LCR, de sérum et d'urine.

Préparation des échantillons (LCR) :

1. Chauffer les échantillons pendant 3 min à 100 °C (p. ex., bain-marie ou bloc chauffant) et laisser refroidir à température ambiante avant l'emploi. Pour une sensibilité optimale, le dépiége de *N. meningitidis* du groupe B et de *E. coli* K1 doit s'effectuer sur des échantillons non chauffés (voir le paragraphe « Limites de la procédure »).
2. Pour les échantillons de LCR turbides, centrifuger après chauffage pendant 10 min à 1400 g avant de procéder au test. Le surnageant constitue l'échantillon à tester.
3. Tester les échantillons comme indiqué au paragraphe « Mode opératoire du test ».

Préparation des échantillons (sérum) :

1. Diluer, à parts égales, les échantillons sériques (0,6 mL au minimum) avec le tampon échantillon **Directigen** et mélanger.
2. Chauffer les échantillons pendant 5 min à 100 °C (p. ex., bain-marie ou bloc chauffant) et laisser refroidir à température ambiante avant l'emploi.
3. À l'aide d'un bâtonnet applicateur en bois, rompre le « caillot » de protéines qui s'est formé et agiter vigoureusement au vortex (pendant environ 5 s).
4. Centrifuger à 1400 g au minimum pendant 15 min.
5. Tester le surnageant liquide comme indiqué au paragraphe « Mode opératoire du test ».

Préparation des échantillons (urine non concentrée) :

1. Diluer, à parts égales, les échantillons d'urine (0,4 mL au minimum) avec le tampon échantillon **Directigen** et mélanger.
2. Chauffer les échantillons pendant 5 min à 100 °C (p. ex., bain-marie ou bloc chauffant) et laisser refroidir à température ambiante avant l'emploi.
3. Centrifuger à 1400 g au minimum pendant 10 min.
4. Tester le surnageant liquide comme indiqué au paragraphe « Mode opératoire du test ».

Préparation des échantillons (urine concentrée) :

1. Centrifuger les échantillons d'urine qui sont turbides ou présentent des particules en suspension à 1400 g pendant 10-min avant de les concentrer.
2. Les échantillons d'urine peuvent être concentrés 25 fois à l'aide d'un concentrateur Minicon B-15 (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts, Etats-Unis).
3. Diluer, à parts égales, 200 µL d'urine concentrée avec le tampon échantillon **Directigen** et mélanger.

4. Chauffer les échantillons pendant 5 min à 100 °C (p. ex., bain-marie ou bloc chauffant) et laisser refroidir à température ambiante avant l'emploi.
5. Centrifuger à 1400 g au minimum pendant 10 min.
6. Tester le surnageant liquide comme indiqué au paragraphe « Mode opératoire du test ».

Préparation à la confirmation des colonies en culture :

1. Localiser les colonies suspectées en surface de la gélose de cultures âgées de 18 – 24 h répondant aux caractéristiques de morphologie et de coloration de Gram des microorganismes adaptés au test par les réactifs au latex Meningitis **Directigen**. **Remarque** : Effectuer une coloration de Gram avant de réaliser le test pour s'assurer que les microorganismes peuvent être testés avec les réactifs au latex Meningitis **Directigen**.
2. Pipeter 0,5 mL (environ 10 gouttes) de réactif **Contrôle** – dans un petit tube à essai en verre (10 x 75 mm ou équivalent).
3. À l'aide d'un ensemeur à anse stérile, sélectionner plusieurs (2 à 3) colonies isolées de morphologie similaire, à partir de la boîte de Pétri d'origine ou d'un repiquage, et réaliser une suspension dans le petit tube à essai pour obtenir une turbidité équivalente à un standard de turbidité McFarland n° 1. **Remarque** : Une inoculation excessive se traduira par une suspension trop dense pouvant donner des résultats erronés.
4. Chauffer les échantillons pendant 3 min à 100 °C (p. ex., bain-marie à ébullition ou bloc chauffant) et les laisser refroidir jusqu'à température ambiante avant de procéder au test.
5. Centrifuger à 1400 g au minimum pendant 10 min.
6. Tester le surnageant comme indiqué au paragraphe « Mode opératoire du test ». **Remarque** : Si des motifs d'agglutination atypiques sont observés, se reporter à « Limites de la procédure ».

Contrôle de qualité par l'utilisateur :

Incorporer des **contrôles positif (+)** et **négatif (-)** à chaque lot d'échantillons testés comme indiqué à l'étape 1, « Mode opératoire du test ».

Effectuer les contrôles de qualité conformément à la réglementation nationale et/ou internationale, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI (anciennement NCCLS) et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

Mode opératoire du test (LCR, sérum, urine, urine concentrée et confirmation de colonies) :

Retirer les réactifs du compartiment réfrigéré et les placer avec la carte dans les puits prévus à cet effet du plateau du poste de travail.

Utiliser exclusivement la carte de test ou la lame en verre recommandée pour cette trousse. Nettoyer complètement la lame en verre avec un tissu non pelucheux avant de l'utiliser.

Consulter le tableau de procédure à la page 32.

1. Déposer une goutte de **Contrôle +** dans les zones de test numérotées de 1 à 6 de la rangée « + ». Déposer une goutte de **Contrôle -** dans les zones de test numérotées de 1 à 6 de la rangée « - ».
2. Déposer à la micropipette 50 µL d'échantillon à tester dans les zones de test numérotées de 1 à 6, rangée « **5** » (échantillon) et dans les zones de test identifiées « **A** » et « **B** ». Les rangées « + » (positif) et « - » (négatif) servent aux contrôles. Les tests d'échantillon suivants peuvent être effectués en utilisant les rangées « + », « - » et « **5** » de cartes de test neuves.
3. Tenir le flacon distributeur par le bouchon et agiter vigoureusement (sans retourner) afin de mélanger parfaitement les **réactifs 1 à 6** et les **réactifs A et B**. Avant de déboucher chaque flacon, tapoter délicatement le fond sur le plan de travail afin de faire tomber le réactif éventuellement retenu dans l'embout.
4. Déposer une goutte de **réactif A** (suspension de latex de contrôle) dans la zone de test « **A** ».
Procéder de même pour distribuer une goutte de **réactif B** (suspension de latex de contrôle) dans la zone de test « **B** ».
5. Déposer une goutte de **réactif 1** (suspension de latex) dans les zones de test de la colonne 1, rangées « + » (positif), « - » (négatif) et « **5** » (échantillon).
Procéder de même avec les suspensions de latex restantes (**réactifs 2 à 6**) dans les rangées « + », « - » et « **5** » des colonnes 2 à 6.
6. Mélanger les échantillons et les réactifs au latex dans chaque zone de test à l'aide d'un agitateur en plastique, en utilisant d'abord la première extrémité, puis l'autre extrémité pour la zone de test suivante. Jeter l'agitateur.
7. Placer la carte ou la lame en verre dans un agitateur rotatif. Recouvrir d'un couvercle humidificateur mouillé afin d'éviter toute évaporation et faire tourner pendant 10 min à une vitesse de 100 ± 2 rpm.
8. À l'issue des 10 min, lire immédiatement les résultats du test par observation macroscopique sous une lampe à incandescence à forte intensité.

Remarque *Pour tester un échantillon (LCR, sérum, urine, urine concentrée ou confirmation de colonie) avec un réactif 1-à-5, utiliser le réactif A. Pour tester un échantillon avec un réactif 6, utiliser le réactif B. Suivre la méthode ci-dessus.*

INTERPRETATION DES RESULTATS DU TEST

Lire d'abord les résultats de test des **contrôles « + »** et « - » : Le **contrôle « + »** doit produire une forte agglutination dans les zones de test de la rangée « + » dans les 10 min qui suivent. Aucune agglutination ne doit être visible dans les zones de test de la rangée « - ». Toute agglutination dans l'une des zones de test contenant le **contrôle « - »** rend la réaction ininterprétable.

Lire les résultats de test des échantillons cliniques :

Test positif – doit montrer une agglutination. Tout degré d'agglutination visible avec l'un des réactifs au latex indique la présence de l'antigène correspondant. *Toute trace d'agglutination dans au moins deux des réactifs au latex ou dans le réactif A (réactifs 1 à 5) ou le réactif B (réactif 6) correspondant rend la réaction ininterprétable.*

Test négatif – Ne doit présenter aucune trace d'agglutination.

LIMITES DE LA PROCEDURE

Ces tests d'agglutination au latex ne sont pas destinés à se substituer à la mise en culture des bactéries. Le diagnostic de confirmation d'une méningite bactérienne repose uniquement sur les méthodes de culture appropriées.

Les échantillons qui présentent des concentrations d'antigène extrêmement faibles, par exemple au début de l'infection, sont susceptibles de donner des résultats faussement négatifs. En outre, des échantillons ayant des concentrations en antigène extrêmement élevées pourraient présenter un phénomène prozone et aboutir à des résultats faussement négatifs. Bien qu'ayant fait l'objet d'études partielles, le phénomène prozone n'a été rapporté qu'avec des échantillons ensemencés avec des concentrations d'antigènes extrêmement élevées et non avec des échantillons cliniques.

Ce dosage est destiné à la détection qualitative des antigènes *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* du groupe A, B, C, Y ou W135 et *E. coli* K1 dans le LCR, le sérum ou l'urine et *Streptococcus* du groupe B dans le LCR et le sérum. La trousses diagnostique peut également être utilisée avec les colonies suspectes de *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* du groupe B et *N. meningitidis* du groupe A, B, C, Y ou W135. Les performances du test avec d'autres types d'échantillon n'ont pas été évaluées.

Le test Meningitis Combo **Directigen** ne peut pas être utilisé avec des milieux d'hémoculture.

Un résultat positif ou négatif pour les streptocoques de groupe B est seulement indicateur de la présence ou de l'absence d'antigènes de streptocoques de groupe B et n'est pas diagnostique de la présence ou de l'absence de maladie à streptocoques de groupe B.

Ne pas substituer ce test à une mise en culture bactérienne pour diagnostiquer une septicémie à streptocoque de groupe B et/ou une méningite.

Un résultat positif ou négatif est un résultat présomptif d'antigène de streptocoque de groupe B. Le résultat doit être confirmé par mise en culture.

Chez le *nourrisson*, les seuls échantillons recommandés pour le dosage qualitatif direct d'antigène de streptocoque de groupe B sont le sérum et le liquide céphalorachidien. L'analyse de l'urine du nourrisson avec des dispositifs de dosage qualitatif direct d'antigène de streptocoque de groupe B n'est pas recommandé à ce jour ; les données de performance actuellement en faveur de l'utilisation de ce test avec l'urine en tant que diagnostic prédictif fiable de maladie à streptocoque sont insuffisantes.

Il est possible que les techniques immunologiques ne détectent pas les souches de pneumocoques et d'*Haemophilus influenzae* de type b dépourvues d'antigène capsulaire.

Certaines réactions croisées avec le réactif *H. influenzae* ont été constatées en présence de *Escherichia coli* K100. De même, le réactif *N. meningitidis* des groupes C et W135 présente une réaction croisée en présence de *Escherichia coli* K92. D'autres réactions croisées, ininterprétables et faussement positives peuvent se produire, mais elles peuvent être réduites, voire éliminées, par une préparation correcte des échantillons (voir « Pré-traitement des échantillons » et « Modes opératoires – Préparation des échantillons »).

Les études portant sur des échantillons de LCR ensemencés avec *N. meningitidis* de groupe B et un antigène de *E. coli* K1 suggèrent qu'une perte de sensibilité peut être observée après chauffage, par comparaison avec les échantillons non chauffés.

Des échantillons de sérum et d'urine non traités peuvent donner des résultats ininterprétables avec les réactifs au latex, et devront être traités comme indiqué au paragraphe « Modes opératoires – Préparation des échantillons ». Les échantillons de LCR présentant une certaine turbidité doivent être centrifugés pendant 10 min à 1400 x g après avoir été chauffés et avant d'être analysés. Le surnageant constitue l'échantillon à tester.

Les échantillons d'urine traitée (voir le paragraphe « Modes opératoires – Préparation des échantillons ») donnant des résultats ininterprétables ou suspects d'être de faux positifs peuvent être filtrés sur filtre MILLIPORE Millex-HA 0,45 µm (#SLHA-02505) et testés à nouveau avec les réactifs de test au latex et les latex de contrôle correspondants.

Il est possible que l'on doive diluer au 1:10 avec le réactif contrôle « - » le surnageant des échantillons de confirmation des colonies qui produisent des réactions d'agglutination ininterprétables ou atypiques. Éviter de créer des suspensions bactériennes plus denses que le standard de turbidité McFarland n° 1.

Ces tests d'agglutination au latex pour l'urine sont très utiles comme indication supplémentaire de la présence de microorganismes pathogènes chez les nouveau-nés ayant de la fièvre avec des signes de localisation.²² Cependant, l'excrétion d'antigènes urinaires peut persister chez les nouveau-nés pendant 3 – 14 jours et jusqu'à 30 jours suivant l'administration d'un vaccin contre l'*Haemophilus influenzae* de type b (Hib). La fréquence et la durée de l'antigénurie dépendent du patient et du type du vaccin administré. Les antécédents de vaccination sont importants pour une interprétation exacte des résultats urinaires positifs Hib chez des nouveau-nés vaccinés.²²⁻²⁴

Certaines souches du groupe *S. viridans* (c.-à-d., *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)²⁵ ont produit des réactions croisées avec le réactif **Directigen S. pneumoniae** au latex. Des tests complémentaires pourront s'avérer nécessaires afin de différencier le groupe des streptocoques *viridans* de *S. pneumoniae*.

Réaliser une coloration de Gram avant d'utiliser l'échantillon pour la procédure de confirmation des colonies. Certains isolats bactériens obtenus à partir de bouillon d'hémoculture qui sont morphologiquement similaires à la colonie suspectée, mais en diffèrent quant à la coloration de Gram, peuvent donner une agglutination non spécifique et/ou des réactions faussement positives (c.-à-d., les espèces bêta-hémolytiques non pathogènes de *Neisseria*) avec le groupe B Strep. latex.

VALEURS ATTENDUES

Haemophilus influenzae de type b, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae* sont responsables d'environ 84 % des cas de méningites bactériennes.³

Streptococcus du groupe B et *Escherichia coli* K1 sont les principaux agents pathogènes bactériens chez le nouveau-né.⁴⁻⁷ Des souches de streptocoques du groupe B et *E. coli* K1 colonisent souvent le vagin et/ou le rectum, et peuvent aussi être responsables de septicémies chez la mère, et, chez le nouveau-né, de septicémies, pneumonies et méningites.⁸

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Sensibilité : Au cours d'une évaluation clinique rétrospective, des échantillons de liquide céphalorachidien (chauffés et non chauffés), de sérum et d'urine ont été analysés en utilisant les réactifs au latex Meningitis **Directigen**. Les échantillons analysés provenaient de patients chez lesquels une infection soit par *Haemophilus influenzae* de type b, soit par *Streptococcus pneumoniae*, soit par *Neisseria meningitidis* des groupes A, B, C, W135 ou par streptocoques du groupe B

avait été confirmée par culture, électrosynérèse (CIE) ou réactif au latex du commerce. Les résultats de test au latex ont été comparés à ceux obtenus par électrosynérèse (CIE) mais tous les échantillons n'ont pas été analysés par CIE (voir tableau 1, page 29). La sensibilité des réactifs au latex Meningitis Directigen pour la détection des antigènes dans les échantillons de LCR, de sérum et d'urine était égale ou supérieure à celle de la CIE.

La sensibilité à *E. coli* K1 a été déterminée en utilisant des bactéries *E. coli* K1 entières, ensemencées dans des liquides organiques, et comparée à celle donnée par un réactif d'agglutination au latex disponible sur le marché. Le réactif au latex Directigen pour *N. meningitidis* du groupe B a permis la détection de *E. coli* K1 dans le LCR (4/4), le sérum (4/4), l'urine (3/4) et les urines concentrées (4/4). Les sensibilités étaient équivalentes ou supérieures à celles observées avec un réactif au latex similaire disponible sur le marché.¹⁵

Chaque réactif au latex Directigen a également été comparé à la CIE en ce qui concerne ses possibilités de détection d'antigènes partiellement purifiés, inoculés dans du LCR, du sérum et de l'urine concentrée. Un immunosérum du marché, spécifique de chaque antigène, a été utilisé dans le test CIE. Une fois encore, les réactifs au latex Directigen se sont avérés plus sensibles que l'électrosynérèse.¹⁵

Spécificité : La spécificité des réactifs Meningitis Directigen a été déterminée par analyse rétrospective et prospective d'échantillons de LCR, de sérum, d'urine et d'urine concentrée au cours de multiples études cliniques (voir tableau 2, page 30). Les tests ont été effectués à la fois sur des échantillons négatifs par culture et sur des échantillons positifs par culture mais non-enregistrés. Les résultats indiquent des plages de spécificité de 97 à 100 % selon le latex et l'échantillon testés.

Confirmation de colonies : Les réactifs au latex ont été testés sur des suspensions de colonies isolées dont les caractéristiques morphologiques correspondaient à celles des microorganismes. Les caractéristiques de performances sont récapitulées dans le tableau 3 (voir page 31).

CONDITIONNEMENT

Ref.	Description
252360	Directigen Meningitis Combo Test – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
255460	Directigen Group B Strep Test – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
252260	Directigen <i>H. influenzae</i> type b Test – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
255560	Directigen <i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1 Test – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
250160	Directigen <i>N. meningitidis</i> groups A, C, Y and W135 Test – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
251960	Directigen <i>S. pneumoniae</i> Test – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
256391	Tampon échantillon Directigen, 8 mL.
252350	Réactif de contrôle négatif Meningitis Directigen, 9 mL, boîte de 4.
278051	Agitateur rotatif de test sur carte Macro-Vue (avec protège-carte humidificateur), 100 ± 2 rpm, minuterie automatique, entraînement à friction, modèle 51-II (110 V).
252480	Directigen Meningitis Combo Test - carte (usage unique), boîte de 30.

REFERENCES: Voir la rubrique « References » du texte anglais.



BD Directigen Meningitis Combo Test

Deutsch

Zum Nachweis von *Haemophilus influenzae* typ b, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, *Streptococcus* groupe B und *Neisseria meningitidis* groupe A, B, C, Y und W135.

VERWENDUNGSZWECK

Der Directigen-Meningitis-Combo-Test ist ein präsumtiver Latex-Agglutinationstest zum direkten, qualitativen Antigen-Nachweis von *H. influenzae* typ b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* groupe A, B, C, Y und W135 und *Escherichia coli* K1 in Zerebrospinalflüssigkeit (Liquor), Serum oder Urin. Der Test kann auch für den direkten qualitativen Nachweis von gruppe-B-Streptokokkenantigenen in Rückenmarksflüssigkeit und im Serum eingesetzt werden. Außerdem bietet das Testkit ein Mittel zur Bestätigung des Vorhandenseins und zur Identifizierung der serologischen Gruppe von vermutlichen Kolonien der folgenden Stämme: *H. influenzae* typ b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* der Gruppe B und *N. meningitidis* Gruppe A, B, C, Y und W135. Wenn eine Probe, die eines dieser bakteriellen Antigene enthält, mit den entsprechenden antikörperbeschichteten Latex-Partikeln zur Reaktion gebracht wird, kommt es zu einer sichtbaren Agglutination.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Die Diagnose von Bakteriämien und Meningitis kann insbesondere bei kleinen Kindern schwierig sein. Bis zu 55 % der betroffenen Kinder werden dem Arzt vorgestellt und mit Antibiotika behandelt, bevor die Meningitis erkannt wird.¹ Der Nachweis der bakteriellen Antigene in der Rückenmarksflüssigkeit ist ein schnelles und nützliches Verfahren der mikrobiologischen Diagnostik. Dieses Verfahren könnte in Fällen teilweise therapierter Meningitis sogar der wichtigste Einzeltest überhaupt sein, da die Gramfärbung und Kultivierung in diesen Fällen negativ ausfallen kann. Der Nachweis eines spezifischen Antigens ist ein klinisch signifikanter Befund und eine große Hilfe bei der Wahl der richtigen Antibiotikatherapie.²

Haemophilus influenzae typ b, *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* wurden als diejenigen drei Pathogene benannt, die für etwa 84 % aller Fälle bakterieller Meningitis verantwortlich sind.³

Streptokokken der Gruppe B und *Escherichia coli* K1 sind bedeutsame bakterielle Pathogene bei Neugeborenen.⁴⁻⁷ Stämme von Streptokokken der Gruppe B und *E. coli* K1 kolonisieren oft die Vagina oder das Rektum und können mit einer mütterlichen oder Neugeborenen-Septikämie, mit Pneumonie und Meningitis in Verbindung gebracht werden.⁸ Das Polysaccharid-Antigen von *E. coli* K1 erwies sich als dem Antigen von *Neisseria meningitidis* Gruppe B strukturell und immunologisch ähnlich.^{9,10} Das Directigen-Latex-Reagenz für *Neisseria meningitidis* Gruppe B unterscheidet zwar nicht zwischen den beiden Antigenen, kann aber nützlich für die Diagnose von durch *E. coli* K1 hervorgerufener Meningitis bei Neugeborenen sein. Wegen der hohen Morbidität und Mortalität in Zusammenhang mit Streptokokken der Gruppe B und mit *E. coli* K1 bei Neugeborenen ist ein rascher und präziser Nachweis dieser Mikroorganismen von größter Wichtigkeit.⁴

Immunologische Nachweismethoden für charakteristische Exoantigene pathogener Mikroorganismen in Patientenflüssigkeiten (Rückenmarksflüssigkeit, Serum, Urin) sind typischerweise schneller als herkömmliche Methoden, wie z.B. die Kultivierung. Zu diesen Nachweismethoden gehören die Kontra-Immunelektrophese (CIE) und die Latex-Agglutination.¹¹⁻¹⁴ Es hat sich herausgestellt, daß die Latex-Agglutination einen schnelleren und empfindlicheren Nachweis des purifizierten Antigens zuläßt, als CIE.¹⁵⁻¹⁷

VERFAHRENSGRUNDLAGEN

Spezifische Antikörper werden an die Oberfläche von Latex-Partikeln gebunden. Die Aggregation von Latex-Partikeln wird groß genug, um eine schnelle optische Erkennung einer positiven Agglutination bei Vorliegen spezifischer Antigene zu ermöglichen. Diese spezifischen löslichen Polysaccharid-Antigene reichern sich nach einer Infektion mit *H. influenzae* typ b, *S. pneumoniae* und *N. meningitidis* gruppe A, B, C, Y oder W135 und *Escherichia coli* K1 in der Rückenmarksflüssigkeit, im Serum oder im Urin an bzw. nach einer Infektion mit Streptokokken der gruppe B im *Streptococcus* in der Rückenmarksflüssigkeit oder im Serum. Diese Antigene lassen sich mit dem **Directigen-Meningitis-Combo-Testkit** nachweisen.

REAGENZIEN

Directigen-Meningitis-Combo-Kit:

Reagenz 1	(1,0 mL)	Anti- <i>H. influenzae</i> typ b, mit polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) beschichtete Latex-Suspension,
Reagenz 2	(1,0 mL)	Anti- <i>S. pneumoniae</i> , mit polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) beschichtete Latex-Suspension,
Reagenz 3	(1,0 mL)	Anti- <i>Streptococcus</i> gruppe B, mit polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) beschichtete Latex-Suspension,
Reagenz 4	(1,0 mL)	Anti- <i>N. meningitidis</i> gruppe C und W135, mit polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) beschichtete Latex-Suspension,
Reagenz 5	(1,0 mL)	Anti- <i>N. meningitidis</i> gruppe A und Y, mit polyklonalen Antikörpern (Kaninchen) beschichtete Latex-Suspension,
Reagenz 6	(1,0 mL)	Anti- <i>N. meningitidis</i> gruppe B und <i>E. coli</i> K1, mit monoklonalen Antikörpern (Maus) beschichtete Latex-Suspension,
Reagenz A	(0,5 mL)	Kontroll-Latex, mit Immunoglobulin (Kaninchen) beschichtete Latex-Suspension,
Reagenz B	(0,5 mL)	Kontroll-Latex, mit Immunoglobulin (Maus) beschichtete Latex-Suspension, jedes Fläschchen enthält 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel),
Kontrolle +	(9,0 mL)	Polyvalente, positive Antigenkontrolle, <i>H. influenzae</i> typ b, <i>S. pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> gruppe B und <i>N. meningitidis</i> gruppe A, B, C, Y und W135-Antigene,
Kontrolle -	(9,0 mL)	Negative Antigen-Kontrolle, glyzingeaufferte Kochsalzlösung mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel),
Probenpuffer	(8,0 mL)	Pufferlösung, enthält EDTA.

Sicherheitshinweise: *In-vitro*-Diagnostikum.

Warnung: Klinische Proben können pathogene Mikroorganismen, wie z.B. Hepatitis-Viren und HIV, enthalten. Beim Umgang mit allen mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten kontaminierten Artikeln sind die „Allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen“¹⁸⁻²¹ sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Nach Gebrauch Probenbehälter und andere kontaminierte Materialien im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

Reagenzien: Verfallsdatum beachten. Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (15 – 30 °C) erwärmen.

Zum Einstellen einer exakten Tropfengröße muß das Tropffläschchen beim Auftragen der Reagenzien senkrecht gehalten werden, so daß nur ein freifallender Tropfen auf einmal aufgetragen wird.

Warnung: Die Reagenzien enthalten Natriumazid. Sehr giftig beim Einatmen, bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken. Bei Kontakt mit Säuren entstehen hochgiftige Gase. Falls es zu Hautkontakt kommt, sofort mit reichlich Wasser abwaschen. Natriumazid kann mit Blei- und Kupferleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Beim Entsorgen mit sehr viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen zu vermeiden.

Kontrollen: Das Kit nicht verwenden, wenn die positiven und negativen Kontrollen (**Kontrolle +** bzw. **Kontrolle -**) nicht die korrekten Resultate erbringen.

Testkarten: Die Reaktion läuft nur korrekt ab, wenn die Testkarten vollständig flach sind. Sollten sie sich gekrümmt haben, sind die Testkarten durch Biegen in Gegenrichtung wieder flach zu machen. Testfelder nicht berühren, da eventuelle Fettsuren zu falschen Ergebnissen führen können. Jede Testkarte nur einmal verwenden und danach verwerfen. Karten in der Originalpackung an einem trockenen Ort bei Raumtemperatur aufbewahren. Beim Mischen der Reagenzien in den Testkarten ist das Verkratzen der Kartenoberfläche mit dem Plastikrührer zu vermeiden. Falls sich eine Probe nicht zum Rand der Testfläche ausbreitet, ist eine andere Testfläche auf der Testkarte zu benutzen.

Testplatte (Glas): Wenn eine Testplatte verwendet wird, sie nach jedem Gebrauch desinfizieren und vor erneutem Gebrauch reinigen. Es wird empfohlen, hierfür ein phenolhaltiges Desinfektionsmittel zu verwenden. Darauf achten, daß vor einer Wiederverwendung alle Reinigungs- und Desinfektionsmittel gründlich vom Objektträger abgespült wurden.

Rotation: Die empfohlene Geschwindigkeit für mechanische Rotation beträgt 100 ± 2 U/min, eine Geschwindigkeit zwischen 95 und 110 U/min beeinflusst die Ergebnisse jedoch nicht wesentlich. Der Rotationsarm sollte in der horizontalen Ebene einen Kreis von etwa 2 cm Durchmesser beschreiben. Um zu vermeiden, daß die Proben dabei austrocknen, sollte während des Rotationsvorgangs ein Verdunstungsschutzdeckel verwendet werden.

Aufbewahrung der Reagenzien: Packung mit den Reagenzien nach Erhalt aus dem Karton nehmen und bei 2 – 8 °C kühl aufbewahren. NICHT EINFRIEREN. Wenn die Reagenzien nicht unmittelbar gebraucht werden, diese wieder verschließen und in den Kühlschrank zurückstellen. Dabei darauf achten, daß die farbcodierten Verschlusskappen nicht vertauscht werden.

ENTNAHME UND HANDHABUNG VON PROBEN

Bezüglich Einzelheiten der Probennahme und Umgang mit den Proben sind einschlägige Lehrbücher zu konsultieren. Die Proben sollten möglichst bald getestet werden. Ist jedoch ein sofortiges Testen nicht möglich, kann die Probe bei 2 – 8 °C gekühlt (bis zu 48 h lang) oder bei -20 °C tiefgekühlt aufbewahrt werden.

Vor dem Test und auch vor der Lagerung muß das Serum vom Blut getrennt werden.

PROBENVORBEHANDLUNG

Die effektivste Methode der Probenbehandlung ist die Verwendung bedeckter Glas-Teströhrchen (Borsilikat) in einem Wasserbad mit 100 °C (kochendem) Wasser. Man kann die Reagenzgläser zwar auch in einen Reaktionsblock stellen, aber aufgrund von Unterschieden im Reagenzglasdurchmesser und in der Probenmenge ist die Durchwärmung der Probe dabei unter Umständen nicht so gleichmäßig.

VERFAHREN

Die Testfläche, alle Reagenzien, das gesamte Untersuchungsmaterial sowie die Verbrauchsmaterialien sollten bei Gebrauch Raumtemperatur (15 – 30 °C) aufweisen.

Mitgelieferte Materialien: Alle im Abschnitt „Reagenzien“ aufgeführten Reagenzien sowie Arbeitsstände, Einweg-Testkarten und Zubehör.

Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Artikel: Rotator, Verdunstungsschutzdeckel, Mikropipettor (50 µL Volumen) und Pipettenspitzen (siehe „Lieferbare Produkte“).

Ebenfalls benötigt werden die erforderlichen Geräte und Utensilien für Präparation, Lagerung und Verarbeitung von Rückenmarksflüssigkeit, Serum- und Urinproben.

Rückenvorbereitung (Rückenmarksflüssigkeit):

1. Proben 3 min lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Raumtemperatur abkühlen lassen. Um optimale Sensitivität zu gewährleisten, sollte der Test auf *N. meningitidis* der Gruppe B und *E. coli* K1 mit unerhitztem Untersuchungsmaterial durchgeführt werden (siehe Abschnitt „Verfahrensbeschränkungen“).
2. Trübe Proben der Rückenmarksflüssigkeit zwischen Erhitzung und Test 10 min lang bei 1400 g zentrifugieren. Getestet wird dann der Flüssigkeitsüberstand.
3. Proben wie im Abschnitt „Testdurchführung“ beschrieben testen.

Probenvorbereitung (Serum):

1. Serumproben von mindestens 0,6 mL im Verhältnis 1:1 mit **Directigen**-Probenpuffer verdünnen und mischen.
2. Proben 5 min lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
3. Ausgefallene Proteingerinnsel mit einem Holzstäbchen ablösen und entfernen, dann 5 s kräftig mischen (Vortex).
4. 15 min lang bei mindestens 1400 g zentrifugieren.
5. Überstand wie im Abschnitt „Testdurchführung“ beschrieben testen.

Probenvorbereitung (nicht konzentrierter Urin):

1. Urinproben von mindestens 0,4 mL im Verhältnis 1:1 mit **Directigen**-Probenpuffer verdünnen und mischen.
2. Proben 5 min lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
3. 10 min lang bei mindestens 1400 g zentrifugieren.
4. Überstand wie im Abschnitt „Testdurchführung“ beschrieben testen.

Probenvorbereitung (konzentrierter Urin):

1. Trübe oder Schwebstoffe enthaltene Urinproben vor dem Konzentrieren 10 min lang bei 1400 g zentrifugieren.
2. Urinproben mit einem minicon-B-15-Konzentrator (Amicon Corporation, Danvers, USA) auf das 25-fache konzentrieren.
3. Mindestens 200 µL Urinkonzentrat im Verhältnis 1:1 mit **Directigen**-Probenpuffer verdünnen und mischen.
4. Proben 5 min lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
5. 10 min lang bei mindestens 1400 g zentrifugieren.
6. Überstand wie im Abschnitt „Testdurchführung“ beschrieben testen.

Vorbereitung zur Bestätigung von durch Kultivierung erhaltenen Kolonien:

1. Auf der Agaroberfläche vermutete Kolonien, die hinsichtlich Morphologie und Gramfärbungsverhalten für das Testen mit **Directigen**-Latex-Reagenzien geeignet sind, ausfindig machen. Die Kolonien sollten aus Kulturen sein, die nicht älter als 18 – 24 h sind. **Hinweis:** Vor dem Testen sollte unbedingt eine Gramfärbung durchgeführt werden, damit sichergestellt ist, daß ein Testen der Mikroorganismen mit den **Directigen**-Latex-Reagenzien auch wirklich sinnvoll ist.
2. 0,5 mL (etwa 10 Tropfen) negative Kontrollflüssigkeit in ein kleines Reagenzglas aus Borsilikat-Glas (10 × 75 mm) geben.
3. Mehrere (2 – 3) isolierte Kolonien ähnlicher Morphologie mit einer sterilen Schlinge aus der Originalkultur oder einer Subkultur entnehmen und in dem erwärmten Reagenzglas suspendieren, so daß die Suspension dem Trübungsstandard 1 nach McFarland entspricht. **Hinweis:** Eine zu starke Inokulierung ergibt eine zu schwere Suspension und damit fehlerhafte Resultate.
4. Suspension 3 min lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterverwenden auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
5. 10 min bei mindestens 1400 g zentrifugieren.
6. Überstand wie unter „Testdurchführung“ beschrieben testen. **Hinweis:** Anweisungen für den Fall, daß atypisches Agglutinationsverhalten beobachtet wird, sind dem Abschnitt „Verfahrensbeschränkungen“ zu entnehmen.

Qualitätssicherung durch den Benutzer:

Die positive **Kontrolle (+)** und die negative **Kontrolle (-)** sollten parallel zu jedem Test mitgetestet werden (siehe Schritt 1 unter „Testdurchführung“).

Es sind die geltenden gesetzlichen und behördlichen und in den Akkreditierungsbedingungen festgelegten Vorschriften zur Qualitätskontrolle sowie die laborinternen Standardvorgaben zur Qualitätskontrolle zu beachten. Benutzer sollten die relevanten CLSI (ehemals NCCLS)-Dokumente und CLIA-Vorschriften über geeignete Testverfahren zur Qualitätskontrolle einsehen.

Testdurchführung (Rückenmarksflüssigkeit, Serum, Urin, konzentrierter Urin, Bestätigung von Kolonien):

Reagenzien aus dem Kühlschrank nehmen. Reagenzien und Testkarte in die hierfür bestimmten Vertiefungen im Arbeitsständer geben.

Nur die für dieses Kit empfohlene Testkarte oder Platte verwenden. Vor Verwendung eines Objektträgers diesen mit einem sauberen, fusselfreien Tuch gründlich abwischen.

Siehe Abbildungen in der Darstellung des Verfahrens auf Seite 32.

1. Einen Tropfen **Kontrolle +** (positiv) auf die Felder 1 – 6 der Reihe + geben. Einen Tropfen **Kontrolle –** (negativ) auf die Felder 1 – 6 der Reihe – aufbringen.
2. Mit der Mikropipette 50 µL der Probe auf die Felder 1 – 6 die Reihe **S** und die Felder **A** und **B** aufbringen. Die Reihen + (positiv) und – (negativ) werden für Kontrollen verwendet. Beim anschließenden Test der Proben werden die Reihen +, – und **S** von neuen Testkarten benutzt.
3. **Reagenzien 1 – 6** und **Reagenzien A** und **B** gründlich mischen. Dazu Dispensier-Fläschchen am Deckel festhalten und kräftig schwenken ohne zu kippen. Vor Entfernen des Deckels Fläschchen aufrecht halten und leicht auf den Tisch klopfen, um eventuell noch in der Tropfkappe verbliebenes Reagenz in das Fläschchen zurückzubefördern.
4. Einen Tropfen **Reagenz A** (Kontroll-Latex-Suspension) auf das Feld **A** geben.
Dann einen Tropfen **Reagenz B** (Kontroll-Latex-Suspension) auf das Feld **B** geben.
5. Einen Tropfen **Reagenz 1** auf die Felder in Spalte 1, Reihe + (positiv), – (negativ) und **S** geben.
Mit den übrigen Latex-Suspensionen (**Reagenzien 2 – 6**) in Spalte 2 – 6 der Reihe +, – und **S** entsprechend verfahren.
6. Proben und Latex-Reagenzien in allen Feldern mit einem Kunststoff-Rührstäbchen verrühren, und zwar immer ein Feld mit dem einen Ende und das nächste Feld mit dem anderen Ende. Rührstäbchen entsorgen.
7. Karte oder Testplatte (Glas) auf einen mechanischen Rotator stellen und **10 min** bei einer Geschwindigkeit von **100 ± 25U/min** rotieren lassen. Einen befeuchteten Deckel als Schutz vor Verdunstung auflegen.
8. Nach genau **10 min** Testergebnis makroskopisch unter einer leuchtstarken Glühfadenlampe ablesen.

Hinweis: *Zum Testen einer Probe (Rückenmarksflüssigkeit, Serum, Urin, konzentrierter Urin oder Bestätigung von Kolonien) mit einem Einzelreagenz 1 – 5 muß Reagenz A verwendet werden. Zum Testen mit einem Einzelreagenz 6 muß Reagenz B verwendet werden. Die Durchführung entspricht der vorhergehenden Beschreibung.*

INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Zuerst das Ergebnis der **positiven** und **negativen Kontrolle** ablesen. **Kontrolle +** (positiv) sollte innerhalb von **10 min** in den Kreisen von Reihe + zu einer starken Agglutination führen. **Kontrolle –** (negativ) sollte Kreisen von Reihe - zu keiner Agglutination führen. Im Falle einer Agglutination in einem der Felder mit **Kontrolle –** (negativ) ist das Ergebnis nicht zu interpretieren.

Probenergebnisse ablesen:

Positive Reaktion: Sollte Agglutination aufweisen. Jegliche sichtbare Agglutination in einem der Antikörper-Latex-Reagenzien zeigt das entsprechende Antigen in der Probe an. *Bei einer Agglutination in zwei oder mehr Latex-Reagenzien oder in dem entsprechenden Reagenz A (reagenz 1 – 5) bzw. Reagenz B (Reagenz 6) ist das Ergebnis nicht zu interpretieren.*

Negative Reaktion: Keine Agglutination.

VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Latex-Agglutinationstests sind nicht als Ersatz für eine Bakterienkultur gedacht. Eine konfirmative Diagnose von bakterieller Meningitis-Infektion ist nur mit Hilfe der entsprechenden Kulturverfahren möglich.

Bei Proben mit extrem niedrigem Antigengehalt, beispielsweise in einem Frühstadium der Infektion, können fälschlicherweise negative Ergebnisse auftreten. Auch bei Proben mit massivem Antigenüberschuß kann andererseits durch das Prozone-Phänomen ein fälschlicherweise negatives Ergebnis zu verzeichnen sein. Das Prozone-Phänomen ist noch nicht intensiv erforscht, wurde bisher aber nur in künstlich mit sehr hohen Antigenkonzentrationen versehenen Proben beobachtet und nicht bei klinischen Proben.

Dieser Test dient dem qualitativen Nachweis von *H. influenzae* typ b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* gruppe A, B, C, Y und W135 und *E. coli* K1 in Liquor, Serum oder Urin sowie *Streptococcus* der gruppe B in Liquor und Serum. Das Testkit kann außerdem für vermutete Kolonien von *H. influenzae* typ b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* gruppe B und *N. meningitidis* gruppe A, B, C, Y und W135 verwendet werden. Das Verhalten bei anderen Probenarten wurde nicht untersucht.

Der **Directigen-Meningitis-Combo-Test** kann nicht mit Blutkulturmedien verwendet werden.

Ein positives oder negatives Ergebnis für Streptokokken gruppe B zeigt nur das Vorhandensein oder die Abwesenheit von gruppe-B-Streptokokkenantigenen an und nicht das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer gruppe-B-Streptokokkenkrankung.

Dieser Test darf nicht als Ersatz für eine Bakterienkultur zur Diagnose von Septikämien oder Meningitis durch Streptokokken gruppe B verwendet werden.

Ein positives oder negatives Ergebnis ist nur ein Präsumtivergebnis. für das gruppe-B-Streptokokkenantigen. Dieses Ergebnis muß durch Kultivierung bestätigt werden.

Bei **Kleinkindern** werden für den direkten qualitativen Nachweis von gruppe-B-Streptokokkenantigenen nur Serum- und Rückenmarksflüssigkeit als Probentypen empfohlen. Das Testen von Kleinkinderurin mit Methoden für den direkten qualitativen Nachweis von gruppe-B-Streptokokkenantigenen wird derzeit nicht empfohlen, Es liegen derzeit nicht genügend Leistungsdaten vor, die den Einsatz dieses Tests bei Kleinkinderurin zur zuverlässigen Prädikation einer gruppe-B-Streptokokkenkrankung stützen würden.

Pneumokokken- und *Haemophilus influenzae*-Stämme typ b, die kein Kapselantigen besitzen, sind u.U. nicht mit immunologischen Testmethoden feststellbar.

Es sind Kreuzreaktionen des *H.-influenzae*-Reagenzien in Anwesenheit von *Escherichia coli* K100 bekannt. Ebenfalls sind Kreuzreaktionen des *N. meningitidis*-Reagenzien gruppe C und W135 in Anwesenheit von *Escherichia coli* K92 bekannt. Weitere Kreuzreaktionen, nicht interpretierbare sowie falsch-positive Ergebnisse können durch eine richtige Probenvorbereitung (s. Abschnitte „Probenvorbereitung“ und „Probenvorbereitung“) minimiert oder vermieden werden.

Untersuchungen an Rückenmarksflüssigkeit, in die künstlich Antigene gegen *N. meningitidis* gruppe B und *E. coli* K1 eingebracht wurden, legen den Schluß nahe, daß die Testempfindlichkeit bei Erhitzen im Vergleich zu nicht erhitzten Proben sinkt.

Nicht vorbehandeltes Serum und Urin kann zu nicht interpretierbaren Ergebnissen führen und sollte gemäß Abschnitt „Probenvorbehandlung“ behandelt werden. Liquor-Proben, die trübe sind, sollten nach dem Erhitzen und vor dem Testen 10 min lang bei 1400 g zentrifugiert werden. Getestet wird dann der Flüssigkeitsüberstand.

Laut Abschnitt „Probenvorbereitung“ vorbehandelte Urinproben, die nicht interpretierbare oder vermutlich falsch-positive Ergebnisse aufweisen, können mit einem Millipore Millex-HA Filter 0,45 µm (SLHA-02505) gefiltert und mit den Latexreagenzien und dem entsprechenden Kontroll-Latex erneut getestet werden.

Bei Kolonie-Bestätigungsproben mit nicht interpretierbaren Resultaten oder atypischen Agglutinationsreaktionen kann eine Verdünnung des Überstandes mit dem Kontrollreagenz – (negativ) im Verhältnis 1:10 erforderlich sein. Bakteriensuspensionen mit einer Trübung von mehr als dem McFarland-Trübungsstandard 1 sind sorgfältig zu vermeiden.

Latex-Agglutinationstests von Urin sind potentiell nützlich als zusätzliches Indiz für eine Anwesenheit von Pathogenen bei ohne lokalisierbare Ursache fiebernden Kleinkindern.²² Jedoch kann die Ausscheidung des Antigens im Urin bei Kleinkindern 3 bis 14 Tage oder sogar bis zu 30 Tage lang nach Gabe von Impfstoffen gegen *Haemophilus influenzae* typ b (Hib) anhalten. Vorkommen und Dauer der Antigenausscheidung sind vom Patienten und von dem jeweiligen Impfstoff abhängig. Die Impfanamnese des Patienten ist wichtig für die korrekte Interpretation von positiven Hib-Antigenergebnissen bei geimpften Kleinkindern.²²⁻²⁴

Manche Stämme der gruppe *S. viridans* (d.h. *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)²⁵ riefen Kreuzreaktionen mit dem **Directigen-S.-pneumoniae**-Latex-Reagenz hervor. Für die Unterscheidung der Viridans-Streptokokken von *S. pneumoniae* können zusätzliche Tests erforderlich sein.

Bei Kolonie-Bestätigungsproben sollte vor dem immunologischen Test erst eine Gramfärbung erfolgen. Bestimmte Bakterienisolate aus Blutkulturplatten, die morphologisch der zu testenden Kolonie ähnlich, aber unvereinbar mit der Gramfärbung sind, können eine nicht spezifische Agglutination und/oder falsch-positive Reaktionen (d.h. betahämolytische nicht pathogene *Neisseria*-Spezies) mit dem Streptokokken-Latex der gruppe B aufweisen.

ERWARTETE WERTE

Haemophilus influenzae typ b, *Neisseria meningitidis* und *Streptococcus pneumoniae* wurden als diejenigen drei Pathogene benannt, die für etwa 84 % aller Fälle bakterieller Meningitis verantwortlich sind.³

Streptokokken der gruppe B und *Escherichia coli* K1 sind bedeutende bakterielle Krankheitserreger bei Neugeborenen.⁴⁻⁷ Stämme von *Streptococcus* der gruppe B und *E. coli* K1 siedeln sich häufig in der Vagina und/oder im Rektum an und können mit einer Septikämie der Mutter, einer neonatalen Septikämie, Pneumonie und Meningitis assoziiert sein.⁸

LEISTUNGSMERKMALE

Empfindlichkeit: In einer Serie retrospektiver klinischer Studien wurden Proben von Rückenmarksflüssigkeit (hitze- und nicht hitzebehandelt), Serum und Urin mit den **Directigen**-Meningitis-Latex-Reagenzien getestet. Diese Proben stammten von Patienten mit einer Infektion mit *Haemophilus influenzae* typ b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* gruppe A, B, C und W135 bzw. *Streptococcus* gruppe B, die durch Kultur-Methoden, Gegenstrom-Immunelektrophorese oder handelsüblichen Latexreagenzien bestätigt wurden. Die Ergebnisse der Latextests wurden ferner mit Gegenstrom-Immunelektrophorese (CIE) verglichen, es wurden jedoch nicht alle Proben mit CIE getestet (**Tabelle 1, siehe Seite 29**). Die **Directigen**-Meningitis-Latex-Reagenzien waren beim Nachweis von Antigen in Rückenmarksflüssigkeit, Serum und Urin mindestens so empfindlich wie eine CIE-Methode.

Die Empfindlichkeit gegenüber *E. coli* K1 wurde ermittelt, indem intakte *E.-coli*-K1-Zellen künstlich in Körperflüssigkeiten eingebracht wurden und mit handelsüblichen Latex-Agglutinationsreagenzien getestet wurden. Mit dem **Directigen**-Latex-Reagenz für *N. meningitidis* der gruppe B ließ sich *E. coli* K1 in Rückenmarksflüssigkeit (4/4), Serum (4/4), Urin (3/4) und konzentriertem Urin (4/4) nachweisen. Die Endtiter-Empfindlichkeit war gleich oder höher als bei einem ähnlichen handelsüblichen Latex-Reagenz.¹⁵

Alle **Directigen**-Latex-Reagenzien wurden ferner mit Gegenstrom-Immunelektrophorese (CIE) auf ihre Eignung zum Nachweis partiell gereinigter Antigene in Rückenmarksflüssigkeit, Serum, Urin oder konzentriertem Urin verglichen. Für den CIE-Test wurde ein handelsübliches Antiserum verwendet, das für jedes der Antigene spezifisch ist. Auch hier waren die **Directigen**-Latex-Reagenzien wieder empfindlicher als die CIE-Methode.¹⁵

Spezifität: In mehreren klinischen Studien wurde die Spezifität der **Directigen**-Meningitis-Reagenzien durch Testen von retrospektiver und prospektiver Rückenmarksflüssigkeit, Serum, Urin und konzentriertem Urin ermittelt (**Tabelle 2, siehe Seite 30**). Sowohl kulturnegative als auch nicht registrierte kulturpositive Proben wurden getestet. Die Daten weisen auf einen Spezifitätsbereich von 97 – 100 % je nach Latex und getesteter Probe hin.

Bestätigung von Kolonien: Die Latex-Reagenzien wurden mit Suspensionen isolierter Kolonien getestet, die den morphologischen Eigenschaften der interessierenden Mikroorganismen entsprechen. Die Leistungsmerkmale sind in **Tabelle 3 (siehe Seite 31)** aufgeführt.

LIEFERBARE PRODUKTE

Best.-Nr. Beschreibung

252360	Directigen Meningitis Combo Test (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
255460	Directigen Group B Strep Test (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
252260	Directigen <i>H. influenzae</i> type b Test (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
255560	Directigen <i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1 Test (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
250160	Directigen <i>N. meningitidis</i> groups A, C, Y and W135 Test (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
251960	Directigen <i>S. pneumoniae</i> Test (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
256391	Directigen -Probenpuffer, 8 mL.
252350	Directigen -Meningitis-Test, negatives Kontrollreagenz, 9 mL (Packung mit 4 Stück).
278051	Macro-Vue -Kartentest-Rotator (mit Verdunstungsschutzdeckel), 100 ± 2 U/min, automatischer Zeitschalter, Reibradantrieb, Modell 51-II (110 V).
252480	Directigen Meningitis-Combo-Testkarte (Einmalgebrauch), Packung mit 30 Stück.

LITERATUR: S. "References" im englischen Text.

BD Directigen Meningitis Combo Test

Per la rilevazione di *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, *Streptococcus* gruppo B e *Neisseria meningitidis* gruppi A, B, C, Y e W135.

Italiano

USO PREVISTO

Directigen Meningitis Combo Test è un test presuntivo di agglutinazione al latex per la rilevazione qualitativa diretta degli antigeni di *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* gruppi A, B, C, Y o W135 ed *Escherichia coli* K1 nel liquido cerebrospinale (LCS), nel siero o nell'urina. Il test può essere utilizzato anche per la rilevazione qualitativa diretta di antigeni di streptococco di gruppo B nel liquido cerebrospinale e nel siero. Il kit di test consente inoltre di confermare e definire il sierogruppo di sospette colonie di *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, streptococco di gruppo B e *N. meningitidis* gruppi A / Y, B o C / W135. Quando il campione contenente uno di questi antigeni batterici viene fatto reagire con microsfere di latex rivestite con i rispettivi anticorpi, si verifica una agglutinazione visibile.

SOMMARIO E SPIEGAZIONE

La diagnosi di batteriemia e di meningite può essere particolarmente difficile, soprattutto nei bambini. La percentuale di bambini visitati da un medico e sottoposti a terapia antibiotica prima che la meningite sia diagnosticata, raggiunge il 55%.¹ La rilevazione di antigeni batterici nel liquido cerebrospinale è un metodo rapido e utile a fini di microbiologia diagnostica e può essere considerato come il singolo test più importante nei casi di meningite parzialmente trattata, in quanto la colorazione di Gram e la coltura possono risultare negative. La rilevazione di un antigene specifico costituisce un riscontro clinico significativo e un valido ausilio per la scelta della terapia antibiotica.²

È stato documentato che *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* rappresentano gli agenti eziologici responsabili di circa l'84% dei casi di meningite batterica.³

Lo streptococco di gruppo B ed *Escherichia coli* K1 sono i principali patogeni batterici nei neonati.⁴⁻⁷ Ceppi di streptococchi di gruppo B e di *Escherichia coli* K1 colonizzano spesso vagina e/o retto e possono essere associati a sepsi puerperale nonché a sepsi, polmonite e meningite neonatale.⁸ L'antigene polisaccaridico di *E. coli* K1 si è dimostrato strutturalmente e immunologicamente simile all'antigene di *Neisseria meningitidis* di gruppo B.^{9,10} Il reagente al latex **Directigen** per *Neisseria meningitidis* di gruppo B non differenzia i due antigeni, ma può essere utile nella diagnosi di meningite neonatale da *Escherichia coli* K1. L'identificazione rapida e accurata di questi microrganismi è estremamente importante alle luce delle elevate morbilità e mortalità associate a streptococchi gruppo B e ad *E. coli* K1 nei neonati.⁴

I metodi immunologici per la rilevazione degli eosantigeni caratteristici dei microrganismi patogeni nei fluidi biologici (liquido cerebrospinale, siero, urina) dei pazienti, sono generalmente più rapidi delle procedure tradizionali come le colture. Queste tecniche comprendono la controimmunolettroforesi (CIE) e l'agglutinazione al latex.¹¹⁻¹⁴ La procedura di agglutinazione al latex si è dimostrata più rapida e sensibile della CIE nella rilevazione di antigeni purificati.¹⁵⁻¹⁷

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Anticorpi specifici vengono legati alla superficie di microsfere di latex. L'aggregazione delle particelle di latex cresce in maniera sufficiente da consentire una rapida visualizzazione di agglutinazione positiva in presenza di antigeni specifici. Questi particolari antigeni polisaccaridici solubili si accumulano nel liquido cerebrospinale, nel siero o nell'urina in seguito a infezioni da *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* gruppi A, B, C, Y o W135 ed *Escherichia coli* K1 e nel liquido cerebrospinale e/o nel siero in seguito a infezione da streptococco di gruppo B. Tutti questi antigeni possono essere rilevati con il kit **Directigen Meningitis Combo Test**.

REAGENTI

Kit Directigen Meningitis Combo

Reagente 1	(1,0 mL),	Anti- <i>H. influenzae</i> tipo b, sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
Reagente 2	(1,0 mL),	Anti- <i>S. pneumoniae</i> , sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
Reagente 3	(1,0 mL),	Anti- <i>Streptococcus</i> gruppo B, sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
Reagente 4	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> gruppi C e W135, sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
Reagente 5	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> gruppi A e Y, sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
Reagente 6	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> gruppo B / <i>E. coli</i> K1, sospensione di latex rivestito di anticorpi monoclonali di topo,
Reagente A	(0,5 mL),	Latex di controllo, sospensione di latex rivestito di immunoglobuline di coniglio,
Reagente B	(0,5 mL),	Latex di controllo, sospensione di latex rivestito di immunoglobuline di topo. Ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante),
Controllo +	(9,0 mL),	Controllo antigene positivo polivalente, antigeni di <i>H. influenzae</i> tipo b, <i>S. pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> gruppo B e <i>N. meningitidis</i> gruppi A, B, C, Y e W135,
Controllo -	(9,0 mL),	Controllo antigene negativo, soluzione fisiologica tamponata con glicina; ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante),
Tampone per campioni	(8,0 mL),	Soluzione tampone per i campioni, contenente EDTA.

Precauzioni - Per uso diagnostico *in vitro*.

Avvertenze - I campioni clinici possono contenere microrganismi patogeni, inclusi i virus dell'epatite e i virus dell'immunodeficienza umana. Manipolare tutti i materiali e gli articoli contaminati con sangue e altri fluidi biologici in conformità alle linee guide dell'istituto e alle "Precauzioni standard".¹⁸⁻²¹ Prima dello smaltimento, sterilizzare in autoclave i contenitori dei campioni e gli altri materiali contaminati.

Reagenti - Non usare oltre la data di scadenza. Una volta estratti i reagenti dal frigorifero, attendere che si portino a temperatura ambiente (15 - 30 °C) prima dell'uso.

Per garantire una dispensazione appropriata delle gocce, tenere i flaconi dei reagenti in posizione verticale e dispensare lasciando cadere una goccia alla volta.

Avvertenza - I reagenti contengono sodio azide, sostanza altamente tossica se inalata, ingerita e in caso di contatto con la pelle. A contatto con acidi, la sodio azide libera gas estremamente tossici. In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente e abbondantemente con acqua. La sodio azide può reagire con il piombo e il rame delle tubature, formando azidi metalliche altamente esplosive. Eliminare la sodio azide facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi per impedire l'accumulo di azidi.

Controlli - Non usare il kit se il **controllo +** e il **controllo -** non danno i risultati appropriati.

Cartoncini di reazione - Per ottenere reazioni corrette, i cartoncini devono essere piatti. Se necessario, appiattire i cartoncini ripiegandoli in senso opposto a quello di deformazione. Prestare attenzione a non lasciare impronte delle dita sulle aree di test del cartoncino, perché così facendo si possono formare depositi oleosi che a loro volta alterano i risultati del test. Usare ciascun cartoncino una sola volta e gettarlo. Conservare i cartoncini nella confezione originale in luogo asciutto a temperatura ambiente. Durante la distribuzione delle sospensioni all'interno dell'area di test, evitare di graffiare la superficie del cartoncino con il miscelatore di plastica. Se il campione non si distribuisce al di fuori del perimetro dell'area di test, usare un'altra area di test del cartoncino.

Vetrino Vetro - Disinfettare ciascun vetrino dopo ogni utilizzo e quindi lavarlo prima di usarlo nuovamente. Si consiglia un disinfettante fenolico. Prima di riutilizzare il vetrino, sciacquarlo accuratamente per eliminare completamente tutti i detergenti e/o disinfettanti.

Rotazione - Si consiglia una velocità di rotazione meccanica di 100 ± 2 giri/min, sebbene velocità comprese tra 95 e 110-giri/min non influenzino significativamente i risultati. Il rotatore deve circoscrivere un cerchio di circa 2 cm di diametro sul piano orizzontale. Usare un coperchio con umidificatore per evitare l'essiccamento dei campioni durante la rotazione.

Conservazione dei reagenti - Al ricevimento, estrarre i reagenti dalla confezione di imballaggio e conservarli a $2 - 8$ °C. **NON CONGELARE.** Richiudere i flaconi dei reagenti e conservarli in frigorifero, facendo attenzione a non scambiare i tappi codificati in base ai colori.

PRELIEVO E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Per informazioni dettagliate sulle procedure di prelievo e trattamento dei campioni, consultare la documentazione appropriata. Testare i campioni non appena possibile; i campioni che non possono essere testati immediatamente devono essere conservati a $2 - 8$ °C (fino a 48 h), oppure a -20 °C.

Prima di testare o conservare il siero, separarlo dal sangue intero.

PRETRATTAMENTO DEI CAMPIONI

L'uso di provette di vetro coperte (borosilicato) in bagnomaria a 100 °C (ebollizione) è il sistema più efficace di trattamento dei campioni. Per il pretrattamento delle provette di vetro è inoltre possibile usare un termoblocco; in tale caso, si possono tuttavia riscontrare maggiori variazioni nel riscaldamento dei campioni dovute a differenze nelle dimensioni delle provette e nel volume dei campioni.

PROCEDURE

Prima dell'uso, l'area di test, i reagenti, i campioni da testare e tutti i componenti da utilizzare nel test devono essere a temperatura ambiente ($15 - 30$ °C).

Materiali forniti - Tutti i materiali elencati alla voce "Reagenti", workstation, cartoncini monouso e accessori.

Materiali necessari ma non forniti - Rotatore, coperchio umidificatore, micropipetta da $50 \mu\text{L}$, puntali per pipetta (vedere "Disponibilità").

Sono inoltre necessarie la strumentazione e l'attrezzatura di laboratorio utilizzate per la preparazione, la conservazione e la manipolazione dei campioni di liquido cerebrospinale, siero e urina.

Preparazione dei campioni (liquido cerebrospinale)

1. Riscaldare i campioni per 3 min a 100 °C (in bagnomaria o termoblocco) e lasciarli raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso. Per una sensibilità ottimale, i test di *N. meningitidis* gruppo B e di *E. coli* K1 devono essere effettuati con campioni non riscaldati (vedere "Limitazioni della Procedura").
2. I campioni di liquido cerebrospinale che evidenziano torbidità, devono essere centrifugati per 10 min a $1400 \times g$ dopo il riscaldamento e prima del test. Usare il sovrantante come campione da testare.
3. Testare i campioni come descritto in "Procedura del test".

Preparazione dei campioni (siero)

1. Diluire 1:1 i campioni di siero di almeno $0,6$ mL con il tampone **Directigen** e mescolare.
2. Riscaldare i campioni per 5 min a 100 °C (in bagnomaria o termoblocco) e lasciarli raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.
3. Con un bastoncino di legno, frammentare il coagulo di proteine formatosi e vortexare energicamente (per circa 5 sec).
4. Centrifugare ad almeno $1400 \times g$ per 15 min.
5. Testare il sovrantante come descritto in "Procedura del test".

Preparazione dei campioni (urina non concentrata)

1. Diluire 1:1 i campioni di urina di almeno $0,4$ mL con tampone **Directigen** e mescolare.
2. Riscaldare i campioni per 5 min a 100 °C (in bagnomaria o termoblocco) e lasciarli raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.
3. Centrifugare ad almeno $1400 \times g$ per 10 min.
4. Testare il sovrantante come descritto in "Procedura del test".

Preparazione dei campioni (urina concentrata)

1. Prima di concentrare campioni di urina torbidi o contenenti particolati, centrifugarli per 10 min. a $1400 \times g$.
2. I campioni di urina possono essere concentrati 25 volte usando un concentratore Minicon B-15 (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts).
3. Diluire 1:1 almeno $200 \mu\text{L}$ di urina concentrata con tampone **Directigen** e mescolare.

- Riscaldare i campioni per 5 min a 100 °C (in bagnomaria o termoblocco) e lasciarli raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Centrifugare ad almeno 1400 x g per 10 min.
- Testare il sovranatante come descritto in "Procedura del test".

Preparazione per la conferma di colonie da coltura

- Sulla superficie dell'agar contenente colture di 18 – 24 uc h, individuare colonie sospette conformi alle caratteristiche morfologiche e di colorazione Gram proprie dei microrganismi idonei al test con i reagenti al latex **Directigen Meningitis**. **Nota** - Prima del test, eseguire una colorazione di Gram per garantire che i microrganismi siano adatti al test con i reagenti al latex **Directigen Meningitis**.
- In una provetta di vetro piccola (10 x 75 mm o equivalente), pipettare 0,5 mL (circa 10 gocce) di reagente di controllo negativo.
- Usando un'ansa sterile, selezionare dalla piastra originale o di subcoltura alcune (2 – 3) colonie isolate morfologicamente simili e sospenderle nella provetta suddetta per ottenere una sospensione uguale a uno standard di torbidità McFarland n.1. **Nota** - Un inoculo eccessivo determina una sospensione troppo pesante che a sua volta può dare luogo a risultati inattendibili.
- Riscaldare la sospensione per 3 min a 100 °C (in bagnomaria o termoblocco) e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente prima del test.
- Centrifugare ad almeno 1400 x g per 10 min.
- Testare il sovrinatante come descritto nella sezione "Procedura del test". **Nota** - Se si riscontrano modalità di agglutinazione atipiche, vedere "Limitazioni della procedura".

Controllo di qualità a cura dell'utente

In ogni batch di campioni, includere i **Controlli positivo (+)** e **negativo (-)** come descritto al punto 1 della sezione "Procedura del test".

Le procedure prescritte per il controllo di qualità devono essere effettuate in conformità alle norme vigenti o ai requisiti di accreditazione e alla prassi di controllo di qualità del laboratorio specifico. Per una guida alla prassi di controllo di qualità appropriata, si consiglia di consultare le norme CLIA e la documentazione CLSI (già NCCLS) in merito.

Procedura del test (liquido cerebrospinale, urina, urina concentrata e conferma di colonie)

Estrarre i reagenti dal frigorifero e collocarli assieme al cartoncino negli appositi pozzetti del vassoio della workstation.

Usare soltanto il vetrino o cartoncino raccomandato per questo kit. Prima di usare il vetrino, pulirlo accuratamente con un panno che non lasci residui.

Vedere le illustrazioni contenute nello Schema di procedura a pagina 32.

- Dispensare una goccia di **Controllo +** sui cerchi 1 – 6 della fila "+". Dispensare una goccia di **Controllo -** sui cerchi 1 – 6 della fila "-".
- Con una micropipetta, dispensare 50 µL di campione da testare nei cerchi 1 – 6 della fila "S" (Campione) e nei cerchi contrassegnati con le lettere "A" e "B". Le file "+" (Positivo) e "-" (Negativo) sono usate per i controlli. I test di campioni successivi possono essere eseguiti utilizzando le file +, - ed S di cartoncini nuovi.
- Tenendo il dispensatore per il tappo, agitare energicamente (senza capovolgere) per mescolare accuratamente i **Reagenti 1 – 6** ed i **Reagenti A e B**. Prima di togliere il tappo ai flaconi, picchiettare delicatamente la base su un ripiano per garantire che nella punta non rimanga alcuna goccia di reagente al latex.
- Dispensare una goccia di **Reagente A** (Sospensione Latex di Controllo) nel cerchio "A". Ripetere la procedura dispensando una goccia di **Reagente B** (Sospensione Latex di Controllo) nel cerchio "B".
- Dispensare una goccia di Sospensione Latex **Reagente 1** sui cerchi della colonna 1, file "+" (Positivo), "-" (Negativo) ed "S" (Campione). Ripetere la procedura con le Sospensioni Latex rimanenti (**Reagenti 2 – 6**) nelle file "+", "-" ed "S", colonne 2 – 6.
- Mescolare i campioni e i reagenti Latex in ogni cerchio con un agitatore di plastica, usando alternativamente un'estremità per il primo cerchio e quindi quella opposta per il cerchio successivo. Gettare l'agitatore.
- Porre il cartoncino o vetrino per il test su un rotatore meccanico e farlo ruotare a 100 ± 2 giri/min per 10 min. Usare un coperchio umidificatore per evitare l'evaporazione.
- Al termine dei 10 min, eseguire immediatamente una lettura macroscopica dei risultati sotto una lampada a incandescenza ad alta intensità.

Nota - Per testare un campione (LCS, siero, urina, urina concentrata o conferma di colonie) con uno solo dei **Reagenti 1 – 5**, usare il **Reagente A**. Per eseguire il test con il solo **Reagente 6**, usare il **Reagente B**. Seguire la procedura sopra descritta.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Registrare innanzi tutto i risultati dei **Controlli +** e -. Il **Controllo +** deve evidenziare una forte agglutinazione nei cerchi della fila "+" entro 10 min, mentre il **Controllo -** non deve mostrare alcuna agglutinazione nei cerchi della fila "-". Un'eventuale agglutinazione in uno dei cerchi contenenti il **Controllo -**, non consente l'interpretazione della reazione.

Registrare i risultati del test dei campioni.

Test Positivo – L'agglutinazione è visibile. La formazione di qualsiasi grado di agglutinazione in uno dei reagenti al latex indica la presenza dell'antigene corrispondente. *Un'eventuale agglutinazione in due o più reagenti al latex o nel corrispondente **Reagente A (Reagenti 1 – 5)** o **Reagente B (Reagente 6)**, non consente l'interpretazione della reazione.*

Test Negativo – Non è visibile alcuna agglutinazione.

LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I test di agglutinazione al latex non sono da considerare come sostitutivi delle colture batteriche. La diagnosi di conferma di meningite batterica è possibile soltanto con le metodiche culturali appropriate.

I campioni con livelli di antigene estremamente bassi, come per esempio nella fase iniziale dell'infezione, possono determinare risultati falsamente negativi. Per contro, i campioni con concentrazioni estremamente elevate di antigene

possono dare luogo a fenomeni di prozona e determinare risultati erroneamente negativi. Seppure non studiati in modo approfondito, i fenomeni di prozona sono stati osservati solo in campioni seminati con livelli estremamente elevati di antigene e non in campioni clinici.

Questa analisi è destinata alla rilevazione qualitativa di antigeni di *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* gruppi A, B, C, Y o W135 ed *E. coli* K1 in campioni di LCS, siero o urina e di streptococco di gruppo B in campioni di LCS e siero. Il kit del test può inoltre essere utilizzato per colonie sospette di *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, streptococco di gruppo B e *N. meningitidis* gruppi A, B, C, Y o CW135. Non sono state accertate le performance con altre tipologie di campione.

Directigen Meningitis Combo Test non può essere usato con terreni per emocoltura.

Un risultato positivo o negativo per lo streptococco di gruppo B indica solo la presenza o l'assenza dell'antigene dello streptococco di gruppo B e non ha valore diagnostico per la presenza o l'assenza di patologie da streptococco di gruppo B. Questo dispositivo non deve essere usato in sostituzione della coltura batterica nella diagnosi di setticemia e/o meningite da streptococco gruppo B.

Un risultato positivo o negativo ha valore presuntivo per l'antigene dello streptococco di gruppo B e deve essere confermato mediante coltura.

Gli unici campioni di lattanti consigliati per la rilevazione qualitativa diretta dell'antigene dello streptococco di gruppo B sono il siero e il liquido cerebrospinale. Al momento, il test delle urine di lattanti con dispositivi di rilevazione qualitativa diretta dell'antigene dello streptococco di gruppo B non può essere consigliato in quanto non vi sono sufficienti dati di performance a supporto dell'uso di tale test come indicatore affidabile di patologie da streptococco di gruppo B.

I ceppi di pneumococco e di *Haemophilus influenzae* tipo b non provvisti di antigene capsulare, non possono essere rilevati con tecniche immunologiche.

È noto che il reagente *H. influenzae* cross-reagisce in presenza di *Escherichia coli* K100 e che il reagente *N. meningitidis* gruppi C e W135 cross-reagisce a sua volta in presenza di *Escherichia coli* K92. Una corretta preparazione dei campioni (vedere "Pretrattamento dei campioni" e "Procedure-Preparazione dei campioni") riduce o elimina la possibilità di altri tipi di reazioni crociate, risultati non interpretabili e falsi positivi.

Alcuni studi eseguiti su campioni di liquido cerebrospinale seminato con antigene *N. meningitidis* gruppo B ed *E. coli* K1, hanno ravvisato qualche perdita di sensibilità nei campioni riscaldati rispetto a quelli non riscaldati.

Il siero e le urine non trattate possono dare risultati non interpretabili con i reagenti al latex e devono pertanto essere trattati come descritto in "Procedure-Preparazione dei campioni". I campioni di LCS torbidi devono essere centrifugati per 10 min a 1400 x g dopo il riscaldamento e prima del test. Usare il sovratanante come campione da testare.

I campioni di urina trattati conformemente a "Procedure-Preparazione dei campioni" che danno risultati non interpretabili o sospetti falsi positivi, possono essere filtrati usando un filtro MILLIPORE Millex-HA 0,45 µm (n. SLHA-02505) e ritestati con i latex reattivi e i latex di controllo corrispondenti.

I campioni per la conferma delle colonie che producono reazioni di agglutinazione atipiche o non interpretabili, possono richiedere una diluizione 1:10 del sovratanante con il reagente di Controllo -. Prestare attenzione a evitare sospensioni batteriche superiori a uno standard di torbidità McFarland n. 1.

Il test di agglutinazione al latex con campioni di urina è utile come conferma supplementare della presenza di microrganismi patogeni nei lattanti che manifestano febbre senza segni di localizzazione.²² L'escrezione di antigene urinario può tuttavia persistere nei neonati per periodi da 3 - 14 giorni a 30 giorni, in seguito alla somministrazione di vaccini di *Haemophilus influenzae* di tipo b (Hib). La frequenza e la durata dell'antigenuria dipendono dal paziente e dal tipo di vaccino somministrato. L'anamnesi vaccinale del paziente è importante per la corretta interpretazione di risultati positivi per l'antigene Hib nei lattanti vaccinati.²²⁻²⁴

Alcuni ceppi del gruppo degli streptococchi viridans (es. *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)²⁵ hanno cross-reagito con il reagente al latex **Directigen S. pneumoniae**. Per differenziare il gruppo degli streptococchi viridans da *S. pneumoniae* potrebbero essere necessari altri test.

Eseguire una colorazione di Gram prima dell'uso con la procedura di conferma delle colonie. Certi isolati batterici ottenuti da piastre di emocoltura, morfologicamente simili alla colonia sospetta ma con colorazione di Gram incompatibile, possono evidenziare un'agglutinazione non specifica e/o reazioni falsamente positive (es. specie beta-emolitiche non patogeni di *Neisseria*) con il latex per streptococchi di gruppo B.

VALORI ATTESI

È stato documentato che *Haemophilus influenzae* tipo b, *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* rappresentano gli agenti eziologici responsabili di circa l'84% dei casi di meningite batterica.³

Lo streptococco di gruppo B ed *Escherichia coli* K1 sono i principali patogeni batterici nei neonati.⁴⁻⁷ Ceppi di streptococchi di gruppo B e di *E. coli* K1 colonizzano spesso vagina e/o retto e possono essere associati a sepsi puerperale e a sepsi, polmonite e meningite neonatale.⁸

PERFORMANCE

Sensibilità - Nel corso di valutazioni cliniche retrospettive, campioni di liquido cerebrospinale (riscaldati e non), siero e urina sono stati testati con i reagenti al latex **Directigen Meningitis**. I campioni testati erano stati originariamente prelevati da pazienti con casi confermati positivi - mediante coltura, controimmunolettroforesi o reagenti al latex in commercio - di *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* gruppi A, B, C, W135 o infezione da streptococco di gruppo B. I risultati dei test al latex sono stati comparati con quelli ottenuti con controimmunolettroforesi (CIE), sebbene non tutti i campioni siano stati testati con questo ultimo metodo (vedere **Tabella 1, pag. 29**). I reagenti al latex **Directigen Meningitis** hanno evidenziato una sensibilità uguale o superiore a quella della controimmunolettroforesi nella rilevazione di antigene in campioni di liquido cerebrospinale, siero e urina.

La sensibilità di *E. coli* K1 è stata determinata usando cellule intere di *E. coli* K1 seminate in fluidi biologici e comparando i risultati al reagente di agglutinazione al latex in commercio. Il reagente al latex **Directigen N. meningitidis** gruppo B ha rilevato *E. coli* K1 nel LCS (4/4), nel siero (4/4), nell'urina (3/4) e nell'urina concentrata (4/4). Le sensibilità di endpoint sono risultate identiche o migliori di quelle osservate con il reagente di agglutinazione al latex in commercio.¹⁵

Ogni reagente al latex **Directigen** è stato inoltre comparato con controimmunolettroforesi per quanto concerne la capacità di rilevare l'antigene parzialmente purificato seminato nel liquido cerebrospinale, nel siero, nell'urina e nell'urina concentrata. Nel test mediante controimmunolettroforesi è stato usato un antisiero in commercio, specifico per ciascun antigene. I reagenti al latex **Directigen** sono risultati più sensibili della controimmunolettroforesi.¹⁵

Specificità - La specificità dei reagenti **Directigen Meningitis** è stata determinata testando campioni retrospettivi e prospettici di LCS, siero, urina e urina concentrata in più studi clinici (vedi **Tabella 2 pag. 30**). Sono stati testati sia campioni

da cultura negativa sia campioni da cultura positiva, non identificati. I dati indicano range di specificità del 97 – 100% a seconda del latex e del campione testati.

Conferma delle colonie - I reagenti al latex sono stati testati usando sospensioni di colonie isolate conformi alle caratteristiche morfologiche di microrganismi. Le performance sono riportate nella **Tabella 3 (vedi pag. 31)**.

DISPONIBILITÀ

N. di cat.	Descrizione
252360	Directigen Meningitis Combo Test , (30 test, 60 controlli)
255460	Directigen Group B Strep Test , (30 test, 60 controlli)
252260	Directigen H. influenzae type b Test , (30 test, 60 controlli)
255560	Directigen N. meningitidis group B / E. coli K1 Test , (30 test, 60 controlli)
250160	Directigen N. meningitidis groups A, C, Y and W135 Test , (30 test, 60 controlli)
251960	Directigen S. pneumoniae Test , (30 test, 60 controlli)
256391	Tampone Directigen , 8 mL
252350	Reagente di controllo negativo Directigen Meningitis , 9 mL, scatola da 4
278051	Rotatore per cartoncini Macro-Vue (con coperchio umidificatore), 100 ± 2 giri/minuto, cronometro, meccanismo a frizione, Modello 51-II (110 V)
252480	Cartoncino per Directigen Meningitis Combo Test (monouso), scatola da 30

BIBLIOGRAFIA: Vedere "References" nel testo inglese.



BD Directigen Meningitis Combo Test

Para a detecção de *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, Grupo B *Streptococcus* e *Neisseria meningitidis* Grupos A, B, C, Y e W135.

Português

UTILIZAÇÃO PREVISTA

A Análise Combinada da Meningite **Directigen**, é uma análise de aglutinação de látex presuntiva para a detecção qualitativa directa dos antígenos da *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* Grupos A, B, C, Y ou W135 e da *Escherichia coli* K1 no fluido cefalorraquidiano (CSF), no soro ou na urina. A análise também pode ser utilizada para detecção qualitativa directa dos antígenos do *Streptococcus* Grupo B no fluido cefalorraquidiano e no soro. Além disso, o kit de análise permite confirmação e proporciona capacidades de agrupamento serológico a partir de colónias suspeitas de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* Grupo B e *N. meningitidis* Grupos A / Y, B ou C / W135. A aglutinação visível ocorre quando uma amostra contendo qualquer um destes antígenos bacterianos reage com as respectivas contas de látex revestidas de anticorpos.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O diagnóstico de bacteremia e de meningite, particularmente em crianças pequenas, nem sempre é fácil. Chega a atingir os 55% o número de crianças que são observadas por um médico que lhes receita um antibiótico antes da meningite ser detectada.¹ A detecção de antígenos microbianos no fluido cefalorraquidiano é um método rápido e útil de diagnóstico microbiológico. Pode mesmo dizer-se que se trata da análise isolada mais importante em casos de meningite parcialmente tratada uma vez que a cultura e a coloração Gram podem dar resultados negativos. A detecção de um antígeno específico é um achado clinicamente significativo e uma ajuda valiosa na escolha do tratamento antimicrobiano.²

Foi referido que o *Haemophilus influenzae* tipo b, a *Neisseria meningitidis* e o *Streptococcus pneumoniae* são os três agentes causadores responsáveis por cerca de 84% dos casos de meningite bacteriana.³

O *Streptococcus* Grupo B e a *Escherichia coli* K1 são dos principais elementos patogénicos bacterianos nos recém nascidos.⁴⁻⁷ Estirpes de estreptococos Grupo B e de *E. coli* K1 colonizam frequentemente a vagina e/ou o recto, podendo estar associados a septicemia materna e pneumonia, meningite e septicemia neonatal.⁸ Demonstrou-se que o antígeno polissacarídico da *E. coli* K1 é estrutural e imunologicamente semelhante ao antígeno da *Neisseria meningitidis* Grupo B.^{9,10} O Reagente de látex **Directigen Neisseria meningitidis** Grupo B não diferencia os dois antígenos mas pode ser útil no diagnóstico de meningite provocada por *E. coli* K1 no recém-nascido. A elevada morbidade e mortalidade associadas aos estreptococos Grupo B e à *E. coli* K1 nos recém-nascidos faz com que a identificação rápida e precisa destes organismos seja da máxima importância.⁴

Os métodos imunológicos para a detecção de exoantígenos característicos dos microorganismos patogénicos nos fluidos dos pacientes (fluido cefalorraquidiano, soro e urina) são geralmente mais rápidos do que os métodos tradicionais como a cultura. Estas técnicas incluem contrimunoelectroforese (CIE) e aglutinação de látex.¹¹⁻¹⁴ Foi demonstrado que o procedimento com aglutinação de látex é mais rápido e sensível do que a CIE na detecção do antígeno purificado.¹⁵⁻¹⁷

PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

Certos anticorpos específicos ligam-se à superfície das contas de látex. A agregação de partículas de látex adquire tamanho suficiente para permitir uma visualização rápida da aglutinação positiva na presença de antígenos específicos. Estes antígenos polissacarídicos solúveis específicos acumulam-se no fluido cefalorraquidiano, no soro ou na urina em resultado de uma infecção por *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* Grupos A, B, C, Y ou W135 e *Escherichia coli* K1; e no fluido cefalorraquidiano e/ou no soro, em resultado de uma infecção por *Streptococcus* Grupo B. Todos estes antígenos podem ser detectados com o Kit para Análise Combinada da Meningite **Directigen**.

REAGENTES

Kit para Análise Combinada da Meningite **Directigen**:

Reagente 1	(1,0 mL),	Anti- <i>H. influenzae</i> tipo b, Suspensão de látex revestida de anticorpos policlonais do coelho,
Reagente 2	(1,0 mL),	Anti- <i>S. pneumoniae</i> , Suspensão de látex revestida de anticorpos policlonais do coelho,
Reagente 3	(1,0 mL),	Anti- <i>Streptococcus</i> Grupo B, Suspensão de látex revestida de anticorpos policlonais do coelho,

Reagente 4	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> Grupos C e W135, Suspensão de látex revestida de anticorpos policlonais do coelho,
Reagente 5	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> Grupos A e Y, Suspensão de látex revestida de anticorpos policlonais do coelho,
Reagente 6	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> Grupo B / <i>E. coli</i> K1, Suspensão de látex revestida de anticorpos monoclonais do rato,
Reagente A	(0,5 mL),	Látex de controlo, Suspensão de látex revestido de imunoglobulina do coelho,
Reagente B	(0,5 mL),	Látex de controlo, Suspensão de látex revestida de imunoglobulina do rato, cada um dos supracitados com azida de sódio a 0,2% (conservante),
Controlo +	(9,0 mL),	Controlo de antígenos positivo polivalente, antígenos da <i>H. influenzae</i> tipo b, <i>S. pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> Grupo B e da <i>N. meningitidis</i> Grupos A, B, C, Y e W135,
Controlo -	(9,0 mL),	Controlo de antígenos negativo, solução salina tamponada de glicina, cada um dos supracitados com azida de sódio a 0,2% (conservante),
Solução tamponada de amostra	(8,0 mL),	Solução tamponada de amostra, contendo EDTA.

Precauções: Para diagnóstico *in vitro*.

Advertência: Nas amostras clínicas podem existir microrganismos patogénicos, incluindo vírus de hepatites e o vírus da imunodeficiência humana. Na manipulação de todos os itens contaminados com sangue e outros líquidos corporais, devem ser seguidas as "Precauções Padrão"¹⁸⁻²¹ e as linhas de orientação institucionais. Antes de proceder à eliminação, esterilize em autoclave os recipientes das amostras e qualquer outro material contaminado.

Reagentes: Não utilize para além do fim do prazo de validade. Depois de retirar do frigorífico, deixar os reagentes aquecerem até à temperatura ambiente (15 – 30°C) antes de os utilizar.

Para garantir uma distribuição correcta das gotas, o frasco de adicionamento de gotas deve ser mantido na vertical, adicionando uma gota autónoma de cada vez.

Advertência: Os reagentes contêm azida de sódio, que é muito tóxica por inalação, em contacto com a pele e quando ingerida. O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico. Após o contacto com a pele, lavar imediatamente com água abundante. A azida de sódio pode reagir com as canalizações de chumbo e cobre, produzindo azidas metálicas altamente explosivas. Quando a eliminar, lave com um grande volume de água para evitar a acumulação de azida.

Controlos: Não utilize o kit se o **Controlo +** e o **Controlo -** não produzirem os resultados apropriados.

Cartões de Análise: Os cartões têm de estar lisos para permitir reacções correctas. Se for necessário, alise os cartões dobrando-os para trás na direcção contrária à curva existente. Deve procurar evitar-se deixar marcas de dedos nas áreas da análise uma vez que essas marcas podem resultar na formação de depósitos gordurosos e em resultados incorrectos da análise. Utilize cada cartão uma vez e depois elimine. Guarde os cartões no embalagem original num local seco, à temperatura ambiente. Quando espalhar dentro dos limites das áreas de análise, evite raspar a superfície do cartão com o misturador de plástico. Se a amostra não se espalhar para o perímetro exterior da área de análise, utilize outra área de análise do cartão.

Lâmina de análise (vidro): No caso de se utilizar a lâmina de vidro, desinfete a lâmina após cada utilização e lave antes de voltar a utilizar. Sugerimos a utilização de um desinfectante fenólico. Certifique-se de que todos os vestígios de detergente e/ou de desinfectantes são completamente retirados da lâmina, irrigando-a, antes de a voltar a utilizar.

Rotação: A velocidade recomendada para rotação mecânica é de 100 ± 2 rpm, mas uma rotação entre 95 e 110 rpm não afecta significativamente os resultados obtidos. O rotador deve circunscrever um círculo com um diâmetro aproximado de 2 cm no plano horizontal. Deve utilizar-se uma cobertura humidificante para evitar que as amostras em análise se sequem durante o processo de rotação.

Armazenamento dos Reagentes: Na altura da recepção, retire a caixa contendo os reagentes e coloque no frigorífico a uma temperatura de 2 – 8°C. NÃO CONGELE. Os reagentes devem ser tapados e colocar de novo no frigorífico quando não estiverem a ser utilizados, com o cuidado de não confundir as tampas codificadas pela cor.

COLHEITA E MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS

Consulte os textos apropriados para obter informações sobre os procedimentos de colheita e manipulação das amostras. As amostras devem ser analisadas o mais cedo possível; no entanto, se não for possível analisar a amostra imediatamente, esta deve ser guardada a uma temperatura entre 2 e 8°C (durante um máximo de 48 h), ou a uma temperatura de -20°C.

O soro deve ser separado do sangue total antes de proceder à análise ou de guardar a amostra.

PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS

A utilização de provetas de vidro tapadas (borossilicato) num banho-maria a 100°C (a ferver) é a forma mais eficaz de tratamento das amostras. Embora se possam utilizar provetas de vidro num bloco térmico, poder-se-ão notar grandes variações no aquecimento por inteiro de uma amostra com resultado das variações no tamanho das provetas e no volume das amostras.

PROCEDIMENTOS

A área de análise, os reagentes, as amostras para análise e os componentes de análise devem encontrar-se à temperatura ambiente (15 – 30°C) quando forem utilizados.

Materiais Fornecidos: Todo o material apresentado sob o título "Reagentes," a estação de trabalho, os cartões de análise descartáveis e os acessórios.

Materiais Necessários Mas Não Fornecidos: Rotador, cobertura humidificante, micropipetador (fornecimento de 50 µL) e pontas de pipetas (ver "Apresentação").

São igualmente exigidos o equipamento e utensílios laboratoriais necessários para a preparação, armazenamento e manipulação das amostras de fluido cefalorraquidiano, soro e urina.

Preparação das amostras (fluido cefalorraquidiano):

1. Aqueça as amostras durante 3 minutos a uma temperatura de 100°C (ex: banho-maria ou bloco térmico) e deixar arrefecer à temperatura ambiente antes de utilizar. Para uma sensibilidade óptima, as análises à *N. meningitidis* Grupo B e à *E. coli* K1 devem ser realizadas em amostras não aquecidas (ver "Limitações do Procedimento").
2. No caso de amostras de fluido cefalorraquidiano que se apresentem turvas, devem centrifugar-se, após o aquecimento, durante 10 minutos a 1400 x g antes de serem analisadas. Deve utilizar-se o fluido sobrenadante como amostra para análise.
3. Analise as amostras conforme se descreve em "Procedimento de Análise".

Preparação das amostras (soro):

1. Dilua amostras de soro de pelo menos 0,6 mL 1:1 com Solução Tamponada de Amostra **Directigen** e misture.
2. Aqueça as amostras durante 5 minutos a uma temperatura de 100°C (ex: banho-maria ou bloco térmico) e deixe arrefecer à temperatura ambiente antes de utilizar.
3. Utilizando um palito aplicador de madeira, desfaça o “coágulo” de proteína que se formou e agite vigorosamente em vórtex (aproximadamente 5 segundos).
4. Centrifugue no mínimo a 1400 x g durante 15 minutos.
5. Analise o fluido sobrenadante conforme se descreve em “Procedimento de Análise”.

Preparação das amostras (urina não concentrada):

1. Dilua amostras de urina de pelo menos 0,4 mL 1:1 com Solução Tamponada de Amostra **Directigen** e misture.
2. Aqueça as amostras durante 5 minutos a uma temperatura de 100°C (ex: banho-maria ou bloco térmico) e deixe arrefecer à temperatura ambiente antes de utilizar.
3. Centrifugue no mínimo a 1400 x g durante 10 minutos.
4. Analise o fluido sobrenadante conforme se descreve em “Procedimento de Análise”.

Preparação das amostras (urina concentrada):

1. As amostras de urina que estiverem turvas ou que apresentarem partículas devem ser centrifugadas a 1400 x g durante 10 minutos antes de serem concentradas.
2. As amostras de urina podem ser concentradas 25 vezes com um concentrador Minicon B-15 (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts).
3. Dilua pelo menos 200 µL de urina concentrada 1:1 com Solução Tamponada de Amostra **Directigen** e misture.
4. Aqueça as amostras durante 5 minutos a uma temperatura de 100°C (ex: banho-maria ou bloco térmico) e deixe arrefecer à temperatura ambiente antes de utilizar.
5. Centrifugue no mínimo a 1400 x g durante 10 minutos.
6. Analise o fluido sobrenadante conforme se descreve em “Procedimento de Análise”.

Preparação para confirmação de colónias a partir de cultura:

1. Procure colónias suspeitas na superfície de agar das culturas de 18 – 24 h que satisfaçam as características morfológicas e de coloração Gram dos organismos que são apropriados para a análise com reagentes de látex **Directigen Meningitis**. **Nota:** Deve realizar-se uma coloração Gram antes da análise de modo a assegurar que os organismos são apropriados para analisar com os reagentes de látex **Directigen Meningitis**.
2. Pipete 0,5 mL (aproximadamente 10 gotas) de Controlo - reagente numa pequena proveta de vidro (10 x 75 mm ou equivalente).
3. Selecciona várias (2 – 3) colónias isoladas de morfologia semelhante da placa do original ou de subcultura utilizando uma ansa estéril e suspenda na proveta acima descrita de modo a obter uma suspensão igual ao padrão de turvação McFarland 1. **Nota:** Uma inoculação excessiva resultará numa suspensão demasiado pesada que pode dar origem a resultados erróneos.
4. Aqueça a suspensão durante 3 minutos a uma temperatura de 100°C (ex: banho-maria a ferver ou bloco térmico) e deixe arrefecer à temperatura ambiente antes de realizar a análise.
5. Centrifugue no mínimo a 1400 x g durante 10 minutos.
6. Analise o sobrenadante conforme se descreve em “Procedimento de Análise”. **Nota:** No caso de se observarem padrões de aglutinação fora do normal, consulte “Limitações do Procedimento”.

Controlo de Qualidade pelo Utilizador:

Inclua uma análise de **Controlo +** e de **Controlo -** com cada lote de amostras analisadas, conforme se descreve no passo 1, “Procedimentos de Análise”.

Os requisitos do controlo de qualidade devem ser efectuados de acordo com os regulamentos ou requisitos de acreditação locais e/ou nacionais aplicáveis e com os procedimentos padrão de controlo de qualidade do seu laboratório. É recomendado que o utilizador consulte as orientações CLSI (anteriormente NCCLS) e os regulamentos CLIA relativamente às práticas de controlo de qualidade apropriadas.

Procedimento de Análise (fluido cerebrospinal, soro, urina, urina concentrada e confirmação de colónias):

Retire os reagentes do armazenamento a frio e coloque os reagentes e o cartão nos poços designados do Tabuleiro da Estação de Trabalho.

Utilize apenas o cartão de análise ou a lâmina de vidro recomendada para este kit. Antes de utilizar a lâmina de vidro, limpe muito bem com um papel que não largue pelos.

Consulte a Ilustração da Tabela do Procedimento, página 32

1. Deite uma gota de **Controlo +** nos círculos 1 a 6 da fila “+”. Deite uma gota de **Controlo -** nos círculos 1 a 6 da fila “-”.
2. Micropipete 50 µL de amostra para análise nos círculos 1 a 6, fila “S” (Sample - Amostra) e nos círculos identificados com “A” e “B”. As filas “+” (Positivo) e “-” (Negativo) são utilizadas para controlos. As análises subsequentes às amostras podem ser realizadas utilizando as filas +, - e S dos novos cartões de análise.
3. Segurando no frasco de distribuição pela tampa, oscile vigorosamente (sem inverter) de modo a misturar meticolosamente os **Reagentes 1 – 6** e os **Reagentes A e B**. Antes de retirar a tampa de cada frasco, bata levemente com a base na parte de cima da bancada de modo a assegurar que não restam vestígios de reagente de látex na ponta.
4. Deite uma gota de **Reagente A** (Suspensão de Látex de Controlo) no círculo “A”. Repita o procedimento, deitando uma gota de **Reagente B** (Suspensão de Látex de controlo) no círculo “B”.
5. Deite uma gota de **Reagente 1** Suspensão de Látex nos círculos na coluna 1, filas “+” (Positivo), “-” (Negativo) e “S” (Amostra). Repita o procedimento para as restantes Suspensões de Látex (**Reagentes 2 – 6**) nas filas “+”, “-” e “S”, colunas 2 a 6.

6. Misture as amostras e os reagentes de látex em cada círculo com um misturador de plástico, utilizando alternadamente uma das pontas e em seguida a extremidade contrária no círculo seguinte. Elimine o misturador.
7. Coloque o cartão ou a lâmina de vidro sobre o rotador mecânico e rode a uma velocidade de 100 ± 2 rpm durante 10 minutos. Utilize uma cobertura humidificante para evitar a evaporação.
8. Logo que terminem os 10 minutos, leia macroscopicamente os resultados da análise, utilizando uma lâmpada incandescente.

Nota: Para analisar uma amostra (fluido cerebrospinal, soro, urina, urina concentrada ou confirmação de colónia) com um Reagente 1 – 5 individual, é necessário utilizar o reagente A. Para analisar com um Reagente 6 individual, é necessário utilizar o Reagente B. Siga o procedimento acima descrito.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA ANÁLISE

Tome nota primeiro dos resultados da análise com **Controlo +** e **Controlo -**: O **Controlo +** deve apresentar, num espaço de 10 minutos, uma forte aglutinação nos círculos de fila "+". O **Controlo -** não deve apresentar qualquer tipo de aglutinação nos círculos de fila "-". A presença de aglutinação em qualquer um dos círculos contendo **Controlo -** torna impossível a interpretação da reacção.

Tome nota dos resultados de análise da amostra:

Análise Positiva – Deve apresentar aglutinação. Qualquer grau de aglutinação presente num dos reagentes de látex indica a presença do antígeno correspondente. A aglutinação em dois ou mais reagentes de látex ou do correspondente **Reagente A (Reagentes 1-5) ou Reagente B (Reagente 6)** torna impossível a interpretação da reacção.

Análise Negativa – Não deve apresentar nenhuma aglutinação.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Estas análises de aglutinação do látex não se destinam a substituir a cultura bacteriana. O diagnóstico de confirmação de uma meningite bacteriana só é possível com os procedimentos de cultura apropriados.

As amostras com níveis muito baixos de antígeno, por exemplo numa fase inicial da infecção, podem dar origem a resultados falsos negativos. Além disso, as amostras com concentrações excessivamente elevadas de antígeno podem apresentar efeitos prozona que podem dar origem a resultados incorrectamente negativos. Embora não tenham sido extensamente estudados, os fenómenos de prozona foram apenas observados em amostras semeadas com níveis extremamente elevados de antígenos e não em amostras clínicas.

Este ensaio destina-se à detecção qualitativa de antígenos da *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* Grupos A, B, C, Y ou W135 e *E. coli* K1 no fluido cerebrospinal, no soro ou na urina; e do *Streptococcus* Grupo B no fluido cerebrospinal e no soro. Além disso, o kit de análise também pode ser utilizado com colónias suspeitas de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* Grupo B e *N. meningitidis* Grupos A, B, C, Y ou W135. Não foi avaliado o desempenho com outros tipos de amostras.

A Análise Combinada da Meningite **Directigen** não pode ser utilizada com meio de cultura de sangue.

Um resultado estreptocócico de Grupo B positivo ou negativo é apenas indicativo da presença ou ausência do antígeno estreptocócico de Grupo B e não serve de diagnóstico para a presença ou ausência de doença estreptocócica de Grupo B.

Este dispositivo não deve ser utilizado como substituto para a cultura bacteriana no diagnóstico da meningite e/ou septicemia estreptocócica de Grupo B.

Um resultado positivo ou negativo é um resultado presuntivo para o antígeno estreptocócico de Grupo B. É necessário confirmar o resultado através de cultura.

As únicas amostras de bebês que se recomendam para a detecção qualitativa directa dos antígenos estreptocócicos de Grupo B são o soro e o fluido cerebrospinal. Não se recomenda actualmente a análise à urina de bebês com dispositivos para detecção qualitativa directa do antígeno estreptocócico de Grupo B; não existem actualmente dados de desempenho suficientes que corroborem a utilização desta análise à urina como meio fiável de detecção da doença estreptocócica de Grupo B.

As estirpes pneumocócicas e da *Haemophilus influenzae* tipo b que não possuem um antígeno capsular podem não ser detectadas através de técnicas imunológicas.

Sabe-se que podem ocorrer reacções cruzadas do reagente da *H. influenzae* na presença da *Escherichia coli* K100. Sabe-se que o reagente da *N. meningitidis* Grupos C e W135 pode fazer uma reacção cruzada na presença da *Escherichia coli* K92. Podem ocorrer outras reacções cruzadas, resultados impossíveis de interpretar e falsos positivos que podem ser reduzidos ou eliminados através de uma correcta preparação das amostras (ver "Pré-tratamentos de amostras" e "Procedimentos-Preparação das amostras").

Estudos realizados com amostras de fluido cerebrospinal semeadas com antígeno de *N. meningitidis* Grupo B e de *E. coli* K1 sugeriram que o aquecimento das amostras pode resultar nalguma perda de sensibilidade relativamente às amostras não aquecidas.

O soro e a urina não tratados podem apresentar resultados impossíveis de interpretar com os reagentes de látex e devem ser tratados como se descreve em "Procedimentos-Preparação das amostras". As amostras de fluido cerebrospinal que se apresentem turvas devem ser centrifugadas durante 10 minutos a 1400 x g ou depois de serem aquecidas e antes de serem analisadas. Deve utilizar-se o fluido sobrenadante como amostra para análise.

As amostras de urina processadas de acordo com os "Procedimentos-Preparação das amostras" que dão origem a resultados impossíveis de interpretar ou a falsos positivos suspeitos podem ser filtradas, utilizando um filtro MILLIPORE Millex-HA 0,45 µm (Nº SLHA-0250S), e voltar a ser analisadas com látex(es) de análise reactivo(s) e os correspondentes látex(es) de controlo.

As amostras de confirmação de colónias que derem origem a reacções impossíveis de interpretar ou a aglutinação fora do normal podem necessitar de uma diluição de 1:10 do sobrenadante com **Controlo -** reagente. Devem tomar-se as devidas precauções para evitar suspensões bacterianas com um padrão de turvação superior a McFarland 1.

As análises de aglutinação de látex da urina são potencialmente úteis para proporcionarem provas corroborantes da presença de organismos patogénicos em bebês que apresentam febre sem sinais localizados.²² No entanto, a excreção de antígeno na urina pode manter-se nos bebês durante 3 a 14 dias, ou mesmo até 30 dias, após administração de vacinas contra a *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). A frequência e duração da antigenúria dependem do paciente e do tipo de vacina administrada. O passado clínico de vacinação do paciente é importante para a interpretação correcta dos resultados positivos do antígeno do HIB na urina de bebês vacinados.²²⁻²⁴

Ocorreram reações cruzadas em algumas estirpes de estreptococos do grupo viridans (isto é, *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)²⁵ com o reagente de látex **Directigen S. pneumoniae**. Poderá ser necessário realizar outras análises para diferenciar os estreptococos do grupo viridans da *S. pneumoniae*.

Deve realizar-se uma coloração Gram antes da utilização com o procedimento de confirmação de colónia. Alguns isolados bacterianos obtidos em placas de cultura de sangue que são morfológicamente semelhantes mas que na coloração Gram apresentam inconsistências relativamente à colónia suspeita, podem apresentar aglutinação não específica e/ou falsos positivos nas reações (isto é, espécie de *Neisseria beta-hemolítica* não patogénica) com o látex do Estreptococo Grupo B.

VALORES ESPERADOS

Foi referido que o *Haemophilus influenzae* tipo b, a *Neisseria meningitidis* e o *Streptococcus pneumoniae* são os três agentes causadores responsáveis por cerca de 84% dos casos de meningite bacteriana.³

O *Streptococcus* Grupo B e a *Escherichia coli* K1 são dos principais elementos patogénicos bacterianos no recém nascidos.⁴⁻⁷ Estirpes de estreptococos Grupo B e de *E. coli* K1 colonizam frequentemente a vagina e/ou o recto, podendo estar associados a septicemia materna e a pneumonia, meningite e septicemia neonatal.⁸

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Sensibilidade: Numa série de avaliações clínicas retrospectivas, foram analisadas amostras de fluido cefalorraquidiano (aquecidas e não aquecidas), de soro e de urina através da utilização de reagentes de látex **Directigen Meningitis**. As amostras analisadas derivaram originalmente de pacientes com casos confirmadamente positivos de infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* Grupos A, B, C, W135 ou infecção estreptocócica de Grupo B detectada através de cultura, CIE ou reagente de látex comercial. Os resultados obtidos com o látex foram também comparados aos obtidos por contraímunoelctroforese (CIE) mas nem todas as amostras foram analisadas por meio de CIE (**Quadro 1 ver pág. 29**). Os reagentes de látex **Directigen Meningitis** estiveram ao nível da CIE ou apresentaram maior sensibilidade que a CIE na detecção do antígeno nas amostras de fluido cefalorraquidiano, de soro e de urina.

A sensibilidade da *E. coli* K1 foi determinada através da utilização de célula inteira de *E. coli* K1 semeada em fluidos corporais e comparada com reagente de aglutinação de látex comercialmente disponível. O Reagente de Látex **Directigen N. meningitidis** Grupo B foi capaz de detectar *E. coli* K1 no fluido cefalorraquidiano (4/4), no soro (4/4), na urina (3/4) e na urina concentrada (4/4). As sensibilidades do ponto final foram iguais ou melhores do que as observadas com um reagente de látex semelhante disponível comercialmente.¹⁵

Cada um dos reagentes de látex **Directigen** também foi comparado por meio de CIE relativamente à sua capacidade para detectar parcialmente antígeno purificado semeado no fluido cefalorraquidiano, no soro, na urina e na urina concentrada. Na análise com CIE, foi utilizado antissor comercial específico a cada antígeno. Os reagentes de látex **Directigen** apresentaram um grau superior de sensibilidade do que a CIE.¹⁵

Especificidade: A especificidade dos reagentes **Directigen Meningitis** foi determinada por análise retrospectiva e prospectiva de amostras de fluido cefalorraquidiano, soro, urina e urina concentrada em vários estudos clínicos (**Quadro 2 ver pág. 30**). Foram analisadas amostras tanto de cultura negativa como positiva não indexada. Os dados indicam valores de especificidade entre 97 – 100%, dependendo do látex e da amostra analisada.

Confirmação de colónia: Foram analisados reagentes de látex utilizando suspensões de colónias isoladas que satisfiziam as características morfológicas dos organismos. As características de desempenho são apresentadas no **Quadro 3 (ver pág. 31)**.

APRESENTAÇÃO

N.º de Cat. Descrição

252360	Directigen Meningitis Combo Test , (análises para 30 pacientes, 60 Controlos).
255460	Directigen Group B Strep Test , (análises para 30-pacientes, 60 controlos).
252260	Directigen H. influenzae type b Test , (análises para 30 pacientes, 60 controlos).
255560	Directigen N. meningitidis group B / E. coli K1 Test , (análises para 30 pacientes, 60 controlos).
250160	Directigen N. meningitidis grupos A, C, Y and W135 Test, (análises para 30 pacientes, 60 controlos).
251960	Directigen S. pneumoniae Test , (análises para 30-pacientes, 60 controlos).
256391	Solução Tamponada de Amostra Directigen , 8-mL.
252350	Reagente de Controlo Negativo da Directigen Meningitis , 9 mL, Caixa de 4.
278051	Rotador de Análise de Cartões Macro-Vue (com cobertura humidificante), 100 ± 2 rpm, temporizador automático, accionamento de fricção, Modelo 51-II (110 V).
252480	Cartão para Directigen Meningitis Combo Test (utilização única), Caixa de 30.

BIBLIOGRAFIA: Consulte "References" no texto em Inglês.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Importado e Distribuído no Brasil por:

Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda

Rua Cyro Correia Pereira 550, Curitiba – Paraná-Brasil

CNPJ 21.551.379/0013-31

Serviço de Suporte Técnico (11)5185-9961

Registro ANVISA nº 10033430315

Centro de Relacionamento com o Cliente: 0800 0555654

BD Directigen Meningitis Combo Test

Para la detección de *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* K1, *Streptococcus* grupo B y *Neisseria meningitidis* grupos A, B, C, Y y W135.

Español

USO PREVISTO

La prueba **Directigen** Meningitis Combo es una prueba de la presunta aglutinación de látex para la detección cualitativa directa de antígenos de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y o W135 y *Escherichia coli* K1 en líquido cefalorraquídeo (LCR), suero u orina. Esta prueba también puede utilizarse para la detección cualitativa directa de antígenos frente a *Streptococcus* grupo B en el LCR y el suero. Además, el equipo para la prueba tiene capacidades de confirmación y seroagrupación de las colonias presuntas de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* grupo B y *N. meningitidis* de los grupos A / Y, B o C / W135. Cuando una muestra que contiene cualquiera de estos antígenos bacterianos se hace reaccionar con las partículas de látex recubiertas de sus respectivos anticuerpos, se produce una aglutinación visible.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El diagnóstico de bacteriemia y meningitis, especialmente en los niños pequeños, puede ser difícil. Hasta el 55% de los niños son atendidos por un médico y tratados con antibióticos antes de detectarse la meningitis¹. La detección de antígenos microbianos en el LCR es un método rápido y útil para la microbiología diagnóstica. Puede ser la prueba de mayor importancia en casos de meningitis parcialmente tratadas, puesto que, en estas circunstancias, la tinción de Gram y el cultivo pueden ser negativos. La detección de un antígeno específico es un hallazgo clínicamente significativo y una ayuda valiosa a la hora de seleccionar el tratamiento antimicrobiano².

Haemophilus influenzae tipo b, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* se han descrito como los tres agentes responsables de aproximadamente el 84% de los casos de meningitis bacteriana³.

Streptococcus grupo B y *Escherichia coli* K1 son importantes patógenos bacterianos en el recién nacido⁴⁻⁷. Las cepas de estreptococos del grupo B y de *E. coli* K1 colonizan con frecuencia la vagina, el recto o ambas localizaciones, y pueden asociarse a septicemia materna y a septicemia, neumonía y meningitis en el recién nacido⁸. Se ha demostrado que el antígeno polisacárido de *E. coli* K1 es similar desde los puntos de vista estructural e inmunológico al antígeno de *Neisseria meningitidis* del grupo B^{9,10}. El reactivo de látex **Directigen** para *Neisseria meningitidis* del grupo B no diferencia ambos antígenos, pero puede ser de utilidad en el diagnóstico de la meningitis neonatal por *E. coli* K1. La elevada morbimortalidad asociada a los estreptococos del grupo B y a *E. coli* K1 en los recién nacidos hace que sea de extrema importancia identificar de forma rápida y exacta estos microorganismos⁴.

Los métodos inmunológicos para la detección de exoantígenos característicos de microorganismos patógenos en los líquidos del paciente (LCR, suero, orina) son típicamente más rápidos que los métodos tradicionales tales como el cultivo. Estas técnicas son la contrainmunolectroforesis (CIE) y la aglutinación del látex¹¹⁻¹⁴. El procedimiento de aglutinación del látex ha demostrado ser más rápido y sensible que la CIE en la detección de antígeno purificado¹⁵⁻¹⁷.

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Los anticuerpos específicos se encuentran unidos a la superficie de microesferas de látex. La agregación de las partículas de látex alcanza el tamaño suficiente como para permitir una visualización rápida de una aglutinación positiva en presencia de los antígenos específicos [de los anticuerpos]. Estos antígenos polisacáridos solubles específicos se acumulan en el LCR, suero u orina como resultado de la infección causada por *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y o W135 y *Escherichia coli* K1; y en LCR o suero, como resultado de la infección causada por *Streptococcus* grupo B. Todos estos antígenos pueden detectarse con el equipo para la prueba **Directigen** Meningitis Combo.

REACTIVOS

Prueba **Directigen** Meningitis Combo:

- Reactivo 1** (1,0 mL), Anti-*H. influenzae* tipo b, suspensión de látex recubierto de anticuerpos policlonales de conejo,
- Reactivo 2** (1,0 mL), Anti-*S. pneumoniae*, suspensión de látex recubierto de anticuerpos policlonales de conejo,
- Reactivo 3** (1,0 mL), Anti-*Streptococcus* grupo B, suspensión de látex recubierto de anticuerpos policlonales de conejo,
- Reactivo 4** (1,0 mL), Anti-*N. meningitidis* grupos C y W135, suspensión de látex recubierto de anticuerpos policlonales de conejo,
- Reactivo 5** (1,0 mL), Anti-*N. meningitidis* grupos A y Y, suspensión de látex recubierto de anticuerpos policlonales de conejo,
- Reactivo 6** (1,0 mL), Anti-*N. meningitidis* grupo B / *E. coli* K1, suspensión de látex recubierto de anticuerpos monoclonales de ratón,
- Reactivo A** (0,5 mL), Látex de control, suspensión de látex recubierto de inmunoglobulina de conejo,
- Reactivo B** (0,5 mL), Látex de control, suspensión de látex recubierto de inmunoglobulina de ratón, cada reactivo contiene 0,2% de azida sódica (conservante),
- Control +** (9,0 mL), Antígeno positivo polivalente, antígenos de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* grupo B y *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y y W135,
- Control -** (9,0 mL), Control negativo de antígeno, solución salina tamponada con glicina, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante),
- Tampón para muestra** (8,0 mL), Solución tampón para muestras, contiene EDTA.

Precauciones: Para diagnóstico *in vitro*.

Advertencia: En las muestras clínicas puede haber microorganismos patógenos, como los virus de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana. Para la manipulación de todos los elementos contaminados con sangre u otros líquidos corporales, deben seguirse las "Precauciones estándar"¹⁸⁻²¹ y las directivas del centro. Antes de desecharlos, esterilice en autoclave los recipientes para muestras y cualquier otro material contaminado.

Reactivos: No utilice los reactivos después de su fecha de caducidad. Después de sacarlos del refrigerador, deje que alcancen la temperatura ambiente (entre 15 – 30 °C) antes de usarlos.

Para asegurar la dosificación adecuada de las gotas, se debe sostener el frasco dispensador de reactivo en posición vertical y dejar caer las gotas, una por una.

Advertencia: Los reactivos contienen azida sódica, que es sumamente tóxica en caso de inhalación, contacto con la piel e ingestión. El contacto con ácidos libera un gas muy tóxico. En caso de contacto con la piel, lavarla inmediatamente con abundante agua. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre, formando azidas metálicas muy explosivas. Al desechar el material, utilizar un gran volumen de agua para evitar el depósito de azidas.

Controles: No utilizar el equipo si los **controles positivo y negativo** no producen los resultados adecuados.

Tarjetas para prueba: Las tarjetas deben ser planas para que las reacciones sean correctas. En caso necesario, aplane las tarjetas doblándolas en la dirección opuesta a aquella en la que se han combado. Tenga cuidado de no tocar con los dedos las zonas de análisis, pues existe el peligro de dejar restos grasos que podrían alterar los resultados del mismo. Utilice cada tarjeta una sola vez y deséchela. Guarde las tarjetas en el envase original en un lugar seco y a temperatura ambiente. Al extender las sustancias en las zonas de prueba, evite rayar la superficie de la tarjeta con el agitador de plástico. Si la muestra no alcanza el perímetro de la zona de prueba, utilice otra zona de prueba en la misma tarjeta.

Portaobjetos de prueba (vidrio): Si se usa un portaobjetos de vidrio, desinféctelo después de cada utilización y lávelo antes de utilizarlo de nuevo. Se recomienda utilizar un desinfectante fenólico. Cerciórese de que todo el detergente y todo el desinfectante hayan sido eliminados por completo del portaobjetos antes de volver a utilizarlo.

Rotación: La velocidad de rotación mecánica recomendada es de 100 ± 2 rpm, aunque una rotación de 95 a 110 rpm no altera significativamente los resultados obtenidos. El agitador rotativo debe circunscribir aproximadamente un diámetro de 2 cm en el plano horizontal. Debe utilizarse una tapa humidificadora mojada para prevenir la desecación de las muestras durante la rotación.

Almacenamiento de los reactivos: Al recibir los reactivos, extráigalos y refrigérelos entre 2 y 8 °C. NO CONGELAR. Los reactivos deben taparse y volverse a refrigerar cuando no se estén utilizando, tomando precauciones para no mezclar los tapones, dotados de un código de color.

RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE LAS MUESTRAS

Consulte los textos correspondientes para conocer los detalles relativos a los procedimientos de recogida y manipulación de muestras. Las muestras deben analizarse tan pronto como sea posible; no obstante, si la muestra no puede analizarse de inmediato, debe conservarse a 2 – 8 °C (durante un máximo de 48 h), o a -20 °C.

Debe separarse el suero de la sangre completa antes de la prueba o de la conservación.

TRATAMIENTO PRELIMINAR DE LAS MUESTRAS

La manera más eficaz para el tratamiento de las muestras es el uso de tubos de ensayo de vidrio (de borosilicato) con tampón en un baño María a 100 °C (hirviendo). Aunque pueden utilizarse tubos de ensayo de vidrio en un bloque térmico, es posible que se observe una mayor variación en el calentamiento completo de una muestra, debido a las variaciones en el tamaño del tubo y en el volumen de la muestra.

PROCEDIMIENTOS

La zona en que se van a realizar las pruebas, los reactivos, las muestras y los componentes de la prueba debe encontrarse a temperatura ambiente (entre 15 y 30 °C) en el momento de usarse.

Materiales suministrados: Todos los materiales enumerados en la sección "Reactivos", estación de trabajo, tarjetas de análisis desechables y accesorios.

Materiales necesarios pero no suministrados: Agitador rotativo, tapa humidificadora, micropipeta de 50 µL y puntas de pipeta (vea "Disponibilidad").

También es necesario el equipo y material de laboratorio preciso utilizado para la preparación, el almacenamiento y la manipulación de las muestras de LCR, suero y orina.

Preparación de las muestras (LCR):

1. Caliente las muestras durante 3 min a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríen hasta la temperatura ambiente antes de su uso. Para obtener una sensibilidad óptima, las pruebas de *N. meningitidis* grupo B y *E. coli* K1 deben realizarse en muestras sin calentar (véase "Limitaciones del procedimiento").
2. Las muestras de LCR que presenten turbidez deben centrifugarse tras el calentamiento durante 10 min a 1400 x g antes de la prueba. Debe utilizarse como muestra para el análisis el líquido sobrenadante.
3. Analice las muestras tal como se describe en la sección "Procedimiento de análisis".

Preparación de las muestras (suero):

1. Diluya las muestras de suero de al menos 0,6 mL 1:1 con el tampón para muestras **Directigen** y mézclelo.
2. Caliente las muestras durante 5 min a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríen hasta la temperatura ambiente antes de su uso.
3. Con un aplicador de madera, rompa el "coágulo" de proteína que se ha formado y agite las muestras vigorosamente en el vórtex (durante 5 seg aproximadamente).
4. Centrifugue a un mínimo de 1400 x g durante 15 min.
5. Analice el líquido sobrenadante tal como se describe en la sección "Procedimiento de análisis".

Preparación de las muestras (orina no concentrada):

1. Diluya las muestras de orina de al menos 0,4 mL 1:1 con el tampón para muestras **Directigen** y mézclelo.
2. Caliente las muestras durante 5 min a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríen hasta la temperatura ambiente antes de su uso.
3. Centrifugue a un mínimo de 1400 x g durante 10 min.
4. Analice el líquido sobrenadante tal como se describe en la sección "Procedimiento de análisis".

Preparación de las muestras (orina concentrada):

1. Las muestras de orina que presenten turbidez o contengan partículas de material deben centrifugarse a 1400 x g durante 10 min antes de su concentración.
2. Las muestras de orina pueden concentrarse 25 veces con un sistema de concentración Minicon B-15 (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts).

- Diluya al menos 200 µL de orina concentrada 1:1 con el tampón para muestras **Directigen** y mézclelo.
- Caliente las muestras durante 5 min a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríen hasta la temperatura ambiente antes de su uso.
- Centrifugue a un mínimo de 1400 x g durante 10 min.
- Analice el líquido sobrenadante tal como se describe en la sección "Procedimiento de análisis".

Procedimiento para la confirmación de colonias del cultivo:

- En la superficie del agar de cultivos de 18 – 24 h, localice las colonias presuntas que satisfacen las características morfológicas y de la tinción de Gram de los organismos que son apropiados para el análisis con los reactivos de látex **Directigen Meningitis**. **Nota:** Debe realizarse una tinción de Gram antes de la prueba con el fin de verificar que los microorganismos son adecuados para su análisis con los reactivos de látex **Directigen Meningitis**.
- Pipete 0,5 mL (aproximadamente 10 gotas) de reactivo de control negativo en un tubo de ensayo de vidrio pequeño (10 x 75 mm o equivalente).
- Seleccione varias colonias aisladas (2 – 3) de morfología similar a partir de la placa original o de un subcultivo utilizando un asa estéril y suspéndalas en el tubo antes mencionado para lograr una suspensión igual a un estándar de turbidez McFarland N.º 1. **Nota:** Una inoculación excesiva proporcionará una suspensión demasiado densa que puede generar resultados erróneos.
- Caliente la suspensión durante 3 min a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríen hasta la temperatura ambiente antes de la prueba.
- Centrifugue las muestras a un mínimo de 1400 x g durante 10 min.
- Analice el líquido sobrenadante tal como se describe en la sección "Procedimiento de análisis". **Nota:** Si se observan esquemas atípicos de aglutinación, consulte las "Limitaciones del procedimiento".

Control de calidad del usuario:

Incluya pruebas de **controles positivo y negativo** con cada lote de muestras analizadas como se describe en el paso 1, "Procedimiento de análisis."

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar la norma CLSI (antes NCCLS) y normativas de CLIA correspondientes para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

Procedimiento de análisis (LCR, suero, orina, orina concentrada y confirmación de colonias):

Saque los reactivos del refrigerador y colóquelos junto con la tarjeta de análisis en los pocillos designados de la bandeja de la estación de trabajo.

Use solamente el portaobjetos o tarjeta de análisis recomendado para este equipo. Antes de utilizar el portaobjetos de vidrio, límpielo a conciencia con papel tisú sin pelusa.

Consulte la ilustración incluida en el esquema del procedimiento de la página 32.

- Deje caer una gota de **Control +** sobre los círculos 1 a 6 de la fila "+". Deje caer una gota de **Control –** sobre los círculos 1 a 6 de la fila "-".
- Con la micropipeta, coloque 50 µL de la muestra de análisis en los círculos 1 a 6 de la fila "S" (muestra) y en los círculos "A" y "B". Las filas "+" (positivo) y "-" (negativo) son sólo para los controles. Las pruebas de muestras posteriores se pueden realizar utilizando las filas "+", "-", "S" de tarjetas de análisis nuevas.
- Sosteniendo el frasco dispensador por el tapón, agite vigorosamente (sin invertir) para mezclar bien los **Reactivos 1 – 6** y los **Reactivos A y B**. Antes de destapar el frasco, golpee ligeramente la base contra la mesa para asegurarse de que no quede reactivo de látex en la punta.
- Deje caer una gota de **Reactivo A** (suspensión de látex de control) en el círculo "A".
Repita el procedimiento dejando caer una gota de **Reactivo B** (suspensión de látex de control) en el círculo "B".
- Deje caer una gota de **Reactivo 1** sobre los círculos de la columna 1, filas "+" (positivo), "-" (negativo) y "S" (muestra).
Repita el procedimiento para las suspensiones de látex restantes (**Reactivos 2 – 6**) en las filas "+", "-", "S", columnas 2 a 6.
- Mezcle las muestras y los reactivos de látex en cada círculo con un agitador de plástico, utilizando alternativamente primero un extremo y luego el opuesto para el siguiente círculo. Deseche el agitador.
- Coloque la tarjeta o el portaobjetos en un agitador rotativo mecánico y hágalo girar a 100 ± 2 rpm durante 10 min. Use una tapa humidificadora para evitar la evaporación.
- Inmediatamente después de concluir los 10 min, lea los resultados de la prueba macroscópicamente bajo una luz incandescente de alta intensidad.

Nota: Para analizar una muestra (LCR, suero, orina, orina concentrada o confirmación de colonias) con un **Reactivo 1 – 5 individual**, debe utilizarse el **Reactivo A**. Para analizar una muestra con un **Reactivo 6 individual**, debe utilizarse el **Reactivo B**. Utilice el procedimiento anteriormente mencionado.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Registre primero los resultados de los análisis de los **controles positivo y negativo**: El **control positivo** debe producir una aglutinación intensa en los círculos de la fila "+" dentro de los 10 min. El **control negativo** no debe presentar aglutinación en los círculos de la fila "-". Si se produce aglutinación en alguno de los círculos que contenga **control negativo**, el análisis no se puede interpretar.

Registre los resultados del análisis de la muestra:

Análisis positivo: Debe aparecer aglutinación. Cualquier grado de aglutinación presente en uno de los reactivos de látex indica la presencia del antígeno correspondiente. La aglutinación de dos o más reactivos de látex o los **Reactivos A (Reactivos 1 – 5) o Reactivos B (Reactivos 6) correspondientes** hace imposible la interpretación del análisis.

Análisis negativo: No debe aparecer ninguna aglutinación.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Estas pruebas de aglutinación del látex no están destinadas a sustituir al cultivo bacteriano. El diagnóstico que confirme la infección meningea bacteriana solamente es posible mediante los procedimientos apropiados de cultivo.

Las muestras con niveles extremadamente bajos de antígeno, como las tomadas en las primeras fases de la infección, pueden proporcionar resultados falsos negativos. Además, las muestras con concentraciones extremadamente elevadas de antígenos pueden presentar efectos prozona y generar resultados inadecuadamente negativos. Aunque no se han estudiado extensamente, los fenómenos prozona sólo se han observado en muestras sembradas con niveles extremadamente elevados de antígenos, y no en muestras clínicas.

Este análisis ha sido diseñado para la detección cualitativa de los antígenos de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y o W135 y *E. coli* K1 en el LCR, suero u orina y de *Streptococcus* grupo B en el LCR y suero. Además, el equipo puede usarse para colonias en las que se sospecha *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* grupo B, y *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y o W135. No se ha evaluado el rendimiento con otros tipos de muestras.

La prueba **Directigen Meningitis Combo** no puede ser usada con medios de hemocultivo.

Un resultado positivo o negativo para estreptococos del grupo B sólo es indicativo de la presencia o la ausencia del antígeno específico de los estreptococos del grupo B, y no es diagnóstico de la presencia o la ausencia de enfermedad por estreptococos del grupo B.

Este dispositivo no debe utilizarse como sustituto del cultivo bacteriano para el diagnóstico de septicemia o meningitis por estreptococos del grupo B.

Un resultado positivo o negativo es un resultado de presunción para el antígeno específico de los estreptococos del grupo B. El resultado debe confirmarse mediante cultivo.

Las únicas muestras de lactante recomendadas para la detección cualitativa directa del antígeno específico de los estreptococos del grupo B son el suero y el líquido cefalorraquídeo. En este momento, no es posible recomendar el análisis de la orina de lactante con dispositivos para la detección cualitativa directa del antígeno específico de los estreptococos del grupo B; no se dispone en la actualidad de datos suficientes de rendimiento que apoyen el uso de esta prueba en la orina como método de predicción fiable de la enfermedad por estreptococos del grupo B.

Es posible que las cepas de neumococos y de *Haemophilus influenzae* tipo b sin antígeno capsular no sean detectadas mediante técnicas inmunológicas.

Se sabe que se producen reacciones cruzadas del reactivo de *H. influenzae* en presencia de *Escherichia coli* K100 y del reactivo de *N. meningitidis* grupos C y W135 en presencia de *Escherichia coli* K92. Es posible que se produzcan otras reacciones cruzadas, resultados no interpretables y resultados positivos falsos, que pueden reducirse o eliminarse mediante la preparación apropiada de la muestra (véase las secciones "Tratamiento preliminar de las muestras" y "Preparación de las muestras").

Los estudios con muestras de LCR sembradas con antígenos de *N. meningitidis* del grupo B y de *E. coli* K1 han sugerido que el calentamiento puede producir cierta pérdida de sensibilidad de las muestras, en comparación con la observada en las muestras no calentadas.

El suero y la orina no tratados pueden producir resultados no interpretables con los reactivos de látex y deberían tratarse según las indicaciones en la sección "Preparación de las muestras". Las muestras de LCR que aparecen turbias deberán ser centrifugadas durante 10 min a 1400 x g después de ser calentadas y antes de su análisis. Debe utilizarse como muestra para el análisis el líquido sobrenadante.

Las muestras de orina tratadas (vea "Preparación de las muestras") que arrojen resultados no interpretables o positivos que se sospeche son falsos podrán ser filtradas usando el filtro MILLIPORE Millex-HA 0,45 µm (#SLHA-0250S), y podrán ser comprobadas nuevamente con el o los látex de prueba reactiva y el o los látex de control correspondientes.

Las muestras de confirmación de colonias que proporcionen reacciones de aglutinación no interpretables o atípicas pueden requerir una dilución 1:10 del sobrenadante con el reactivo de control negativo. Deben tomarse precauciones para evitar las suspensiones bacterianas superiores al estándar de turbidez de McFarland N.º 1.

Las pruebas urinarias de aglutinación de látex pueden emplearse potencialmente como evidencia de la presencia de organismos patógenos en lactantes que estén sufriendo de fiebre sin signos localizantes²². No obstante, la excreción de antígenos urinarios puede persistir en lactantes por un período de 3 – 14 días, y hasta 30 días, después de la administración de vacunas de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). La frecuencia y duración de la antigenuria dependen del paciente y del tipo de vacuna administrada. Es importante disponer de la historia de vacunación del paciente para poder interpretar correctamente los resultados positivos para el antígeno de Hib en orina en los lactantes vacunados.

Ciertas cepas de estreptococos viridans es decir, (*S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)²⁵ han provocado reacciones cruzadas con el reactivo de látex **Directigen** para *S. pneumoniae*. Pueden ser necesarias pruebas adicionales para diferenciar el grupo de estreptococos viridans de *S. pneumoniae*.

Debe realizarse una tinción de Gram antes del uso con el procedimiento de confirmación de colonias. Ciertos aislados de bacterias obtenidos de placas de hemocultivo que son morfológicamente similares a la colonia sospechada pero de tinción de Gram diferente, pueden presentar aglutinación no específica y/o reacciones falso-positivas (es decir, la especie *Neisseria* beta-hemolítica no patógena) con el látex de grupo B Strep.

VALORES PREVISTOS

Haemophilus influenzae tipo b, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* se han descrito como los tres agentes responsables de aproximadamente el 84% de los casos de meningitis bacteriana³.

Streptococcus grupo B y *Escherichia coli* K1 son patógenos bacterianos de gran importancia en los recién nacidos⁴⁻⁷. Frecuentemente, las cepas de estreptococos grupo B y de *E. coli* K1 colonizan la vagina y/o el recto y pueden provocar septicemia materna y septicemia, neumonía o meningitis en el recién nacido⁸.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Sensibilidad: En una evaluación clínica retrospectiva se analizaron con reactivos de **Directigen Meningitis** muestras de líquido cefalorraquídeo (calentadas y no calentadas), de suero y de orina. Las muestras analizadas se obtuvieron originalmente de pacientes con casos (confirmados por cultivo, CIE o reactivo de látex de uso comercial) de infección por *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* grupos A, B, C, W135 o estreptococos grupo B. Los resultados del análisis por látex se compararon también con los de contraímmunolectroforesis (CIE) pero no se analizaron todas las muestras con CIE (Tabla 1, véase la pág. 29). Los reactivos de látex **Directigen Meningitis** han demostrado ser iguales a o más sensibles que la CIE en la detección del antígeno en muestras de LCR, suero y orina.

La sensibilidad para *E. coli* K1 se determinó utilizando *E. coli* K1 de células enteras sembradas en líquidos corporales en comparación con otro reactivo de aglutinación del látex comercialmente disponible. El reactivo de látex **Directigen** para *N. meningitidis* grupo B pudo detectar *E. coli* K1 en LCR (4/4), suero (4/4), orina (3/4) y orina concentrada (4/4). Las sensibilidades finales resultaron ser iguales o mejores que aquellas observadas con el reactivo de látex comercial¹⁵.

Cada reactivo de látex **Directigen** se comparó también con la contraelectroforesis con respecto a la capacidad de detectar antígenos parcialmente purificados inoculados en LCR, suero, orina y orina concentrada. En la prueba de CIE se utilizó un antisuero para cada antígeno disponible comercialmente. Los reactivos de látex **Directigen** fueron más sensibles que la CIE¹⁵.

Especificidad: Se determinó la especificidad de los reactivos **Directigen** Meningitis analizando muestras retrospectivas y prospectivas de LCR, suero, orina y orina concentrada en varios estudios clínicos (**Tabla 2, véase la pág. 30**). Se analizaron tanto muestras negativas por cultivo así como muestras positivas por cultivo pero no registradas. Los datos indican intervalos de especificidad de 97 – 100%, según el látex y la muestra analizada.

Confirmación de colonias: Los reactivos de látex se analizaron utilizando suspensiones de colonias aisladas que cumplieran las características morfológicas de los microorganismos. Las características del rendimiento se describen en la **Tabla 3 (véase la pág. 31)**.

PRESENTACIÓN

N.º ref.	Descripción
252360	Directigen Meningitis Combo Test, (30 análisis de pacientes, 60 controles).
255460	Directigen Group B Strep Test (30 análisis de pacientes, 60 controles).
252260	Directigen <i>H. influenzae</i> type b Test (30 análisis de pacientes, 60 controles).
255560	Directigen <i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1 Test (30 análisis de pacientes, 60 controles).
250160	Directigen <i>N. meningitidis</i> groups A, C, Y and W135 Test (30 análisis de pacientes, 60 controles).
251960	Directigen <i>S. pneumoniae</i> Test (30 análisis de pacientes, 60 controles).
256391	Tampón para muestras Directigen , 8 mL.
252350	Reactivo de control negativo Directigen Meningitis, 9 mL, caja de 4.
278051	Agitador rotativo de la prueba en tarjeta Macro-Vue (con tapa humidificadora), 100 ± 2 rpm, cronómetro automático, mecanismo impulsor por fricción, Modelo 51-II (110 V).
252480	Tarjeta para Directigen Meningitis Combo Test (para un solo uso), caja de 30.

REFERENCIAS: Véase la sección "References" en el texto inglés.

Table 1 / Tableau 1 / Tabelle 1 / Tabella 1 / Quadro 1 / Tabla 1

Comparison of Directigen™ and CIE in Stored Samples / Comparaison entre Directigen et CIE sur des échantillons conservés / Vergleich Directigen und Test mit Gegenstrom-Immunelektrophorese (CIE) in gelagerten Proben / Confronto tra Directigen e CIE in campioni conservati / Comparação entre Directigen e CIE em amostras armazenadas / Comparación de Directigen y CIE en muestras conservadas

Specimen Echantillon Probe Campione Amostra Muestra	Antigen Present Antigène présent Antigen vorhanden Antigene presente Antigénio Presente Antígeno presente	Methods Méthodes Methoden Metodi Métodos	No. Positive Nombre de positifs Anzahl der positiven Risultati positivi N° Positivos Resultados positivos	No. Negative Nombre de négatifs Anzahl der negativen Risultati negativi N° Negativos Resultados negativos
CSF LCR Liquor LCS	<i>H. influenzae</i> type b / de type b / typ b / tipo b	Directigen CIE	83 66	14 31
	<i>S. pneumoniae</i>	Directigen CIE	36 33	9 12
	group B <i>Streptococcus</i> / du groupe B / groupe B / gruppo B / grupo B	Directigen CIE	18 2	6 4
	<i>N. meningitidis</i> group A / du groupe A / groupe A / gruppo A / grupo A	Directigen CIE	22 Not Tested	3 Not Tested
	<i>N. meningitidis</i> group B / du groupe B / groupe B / gruppo B / grupo B	Directigen CIE	11 7	16 20
	<i>N. meningitidis</i> group C or W135 / des groupes C ou W135 / groupe C oder W135 / gruppi C o W135 / grupo C o W135	Directigen CIE	8 2	0 4
Serum Sérum Siero Soro Suero	<i>H. influenzae</i> type b / de type b / typ b / tipo b	Directigen CIE	7 5	2 4
	<i>S. pneumoniae</i>	Directigen CIE	17 17	5 5
	<i>N. meningitidis</i> group A, B, C or W135 / des groupes A, B, C ou W135 / groupe A, B, C oder W135 / gruppi A, B, C o W135 / grupo A, B, C o W135	Directigen CIE	12 7	9 13
Urine Urin Urina Orina	<i>H. influenzae</i> type b / de type b / typ b / tipo b	Directigen CIE	12 2	4 14
	<i>S. pneumoniae</i>	Directigen CIE	7 1	12 18
	group B <i>Streptococcus</i> / du groupe B / groupe B / gruppo B / grupo B	Directigen CIE	41 2	16 3
	<i>N. meningitidis</i> group A or C / des groupes A ou C / groupe A oder C / gruppi A o C / grupo A o C	Directigen CIE	5 1	2 4

Table 2 / Tableau 2 / Tabelle 2 / Tabella 2 / Quadro 2 /Tabla 2

Specificity Testing of Culture Negative and Culture Positive Clinical Specimens / Tests de spécificité clinique négatifs ou positifs par culture / Spezifitätstest von in Kulturen negativen und positiven klinischen Proben / Analisi di specificità dei campioni positivi e negativi in coltura / Testes de especificidade de amostras clínicas de cultura negativa e de cultura positiva / Análisis de especificidad de muestras positivas y negativas por cultivo

Specimen Echantillon Probe Campioni Amostra Muestra	Latex Reagent Réactif au latex Latex-Reagenz Reagente al latex Reagente de látex Reactivo de látex	Number Tested Nombre testé Anzahl der Test-proben Numero di analisi N° Testados Muestras analizadas	Number Negative Nombre de négatifs Anzahl der negativen Proben Numero di risultati negativi N° Negativos Resultados negativos	Specificity % Spécificité % Spezifität in % Specificità (%) % Especificidade Especificidad %
CSF	<i>H. influenzae</i> type b	146	146	100
	<i>S. pneumoniae</i>	146	146	100
	group B <i>Streptococcus</i>	127	127	100
	<i>N. meningitidis</i> groups C / W135	236	232	98.3
	<i>N. meningitidis</i> groups A / Y	75	74	98.7
	<i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1	148	148	100
Serum	<i>H. influenzae</i> type b	124	124	100
	<i>S. pneumoniae</i>	125	125	100
	group B <i>Streptococcus</i>	64	64	100
	<i>N. meningitidis</i> groups C / W135	143	143	100
	<i>N. meningitidis</i> groups A / Y	36	35	97.2
	<i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1	126	126	100
Urine	<i>H. influenzae</i> type b	120	119	99
	<i>S. pneumoniae</i>	120	119	99
	group B <i>Streptococcus</i>	82	81	98.7
	<i>N. meningitidis</i> groups C / W135	147	147	100
	<i>N. meningitidis</i> groups A / Y	51	50	98
	<i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1	120	120	100
Urine (concentrated)	<i>H. influenzae</i> type b	30	30	100
	<i>S. pneumoniae</i>	30	29	97
	group B <i>Streptococcus</i>	41	40	97.5
	<i>N. meningitidis</i> groups C / W135	53	52	98.1
	<i>N. meningitidis</i> groups A / Y	37	37	100
	<i>N. meningitidis</i> group B / <i>E. coli</i> K1	30	30	100

Table 3 / Tableau 3 / Tabelle 3 / Tabella 3 / Quadro 3 / Tabla 3

Colony Confirmation Performance Characteristics / Les caractéristiques de performance de la confirmation des colonies / Kennwerte für die Bestätigung von Kolonien / Caratteristiche di performance della conferma di colonie / Características do desempenho de confirmação de colónias / Características del rendimiento de la confirmación de colonias

Directigen Meningitis vs. Biochemical Identification / Comparaison entre le Test **Directigen** Meningitis et la procédure d'identification biochimique / **Directigen** Meningitis i. Vgl. zur biochemischen Identifikation / **Directigen** Meningitis vs. identificazione biochimica / **Directigen** Meningitis vs. Identificação Bioquímica / **Directigen** Meningitis vs. identificación bioquímica

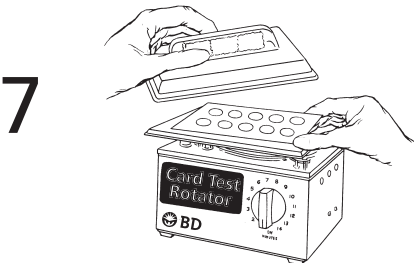
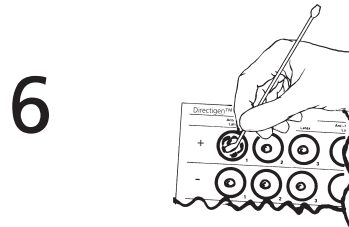
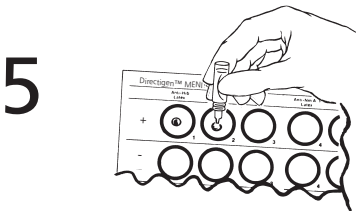
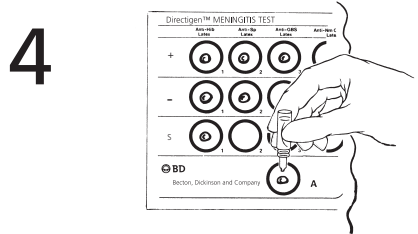
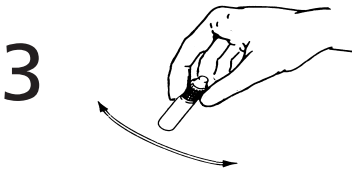
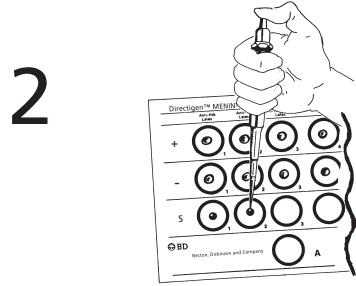
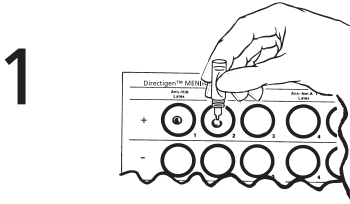
Suspected Organism Organisme suspecté Vermuteter Organismus Testproben Organismo sospetto Microorganismo Suspeito Organismo presunto	No. Tested Nombre testé Anzahl der Testproben Numero di analisi N° Testados Muestras analizadas	Relative Sensitivity (95% Confidence Interval) / Sensibilité relative (Intervalle de confiance 95 %) / Relative Empfindlichkeit (Vertrauensintervall ist 95 %) / Sensibilità relativa (Intervallo di confidenza del 95%) / Sensibilidade Relativa (Intervalo de Confiança 95%) / Sensibilidad relativa (intervalo de confianza del 95%)	Relative Specificity (95% Confidence Interval) / Spécificité relative (Intervalle de confiance 95 %) / Relative Spezifität (Vertrauensintervall Testergebnisse in % / Specificità relativa (Intervallo di confidenza del 95%) / Especificidade Relativa (Intervalo de Confiança 95%) / Especificidad relativa (intervalo de confianza del 95%)	% Uninterpretable Initial Testing / % Tests initiaux non interprétables / Nicht interpretierbare erste Testergebnisse in % / % di analisi iniziali non interpretabili / % Análises Iniciais Não Interpretáveis / % de análisis inicial no interpretable
<i>H. influenzae</i> type b	112	100% (92 – 100)	98.5% (92 – 100) ²	3.6%
<i>S. pneumoniae</i>	124	93% (84 – 98)	79.0% (66 – 88) ¹	0%
group B <i>Streptococcus</i>	129	100% (95 – 100)	90.5% (80 – 96) ¹	0%
<i>Neisseria meningitidis</i> group A / Y	106	100% (83 – 100)	100% (96 – 100) ²	10.4%
<i>Neisseria meningitidis</i> group C / W135	94	96% (82 – 100)	98.5% (92 – 100) ²	11.7%
<i>Neisseria meningitidis</i> group B	106	85% (55 – 98)	100% (96 – 100) ²	4.7%










1 Refer to the "Limitations of The Procedure". / Se référer à "Limites de la méthode". / Siehe: "Verfahrensbeschränkungen". / Vedere "Limitazioni della procedura". / Consulte as "Limitações do Procedimento". / Refiérase a "Limitaciones del procedimiento".

2 Results after repeat testing with 1:10 dilution. / Résultats après une répétition des tests avec une dilution au 1:10. / Ergebnisse nach Testwiederholung mit einer 1:10 Verdünnung. / Risultati ottenuti dopo ripetizione del test con diluizione 1:10. / Resultados após repetição da análise com diluição 1:10. / Resultados obtenidos después de pruebas repetidas con dilución 1:10.

Procedural Chart / Tableau de procédure / Darstellung des Verfahrens /
 Schema di procedura / Tabela do Procedimento / Esquema del
 procedimiento

Performance of Test / Exécution du test / Durchführung des Tests /
 Esecuzione del test / Desempenho da Análise / Realización de la prueba



Directigen™ MENINGITIS TEST			
	Anti-Hib Latex	Anti-Sp Latex	Anti-GBS Latex
+	 1	 2	 3
-	 1	 2	 3
S	 1	 2	 3



Manufacturer / Výrobce / Producent / Fabrikant / Tootja / Valmistaja / Fabricant / Hersteller / Κατασκευαστής / Gyártó / Ditta produttrice / Gamintojas / Producent / Fabricante / Výrobca / Tillverkare / Производител / Producător / Üretici / Proizvođač / Производител / Атқарушы



Use by / Spotføjte do / Anvendes før / Houdbaar tot / Kasutada enne / Viimeinkäyttöpäivä / A utiliser avant / Verwendbar bis / Ημερομηνία λήξης / Felhasználhatóság dátuma / Usare entro / Naudokite iki / Brukes før / Stosować do / Utilizar em / Použítě do / Usar antes de / Använd före / Ισπονηζείτε do / A se utiliza până la / Son kullannulla tarihi / Upotrebiti do / Исползовать до / дейін пайдаланура / Upotrijebiti do /
 YYYY-MM-DD / YYYY-MM (MM = end of month) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = konec měsíce) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutning af måned) /
 JJJJ-MM-DD / JJJJ-MM (MM = einde maand) /
 AAAA-KK-PP / AAAA-KK (KK = kuu lõpp) /
 VVVV-KK-PP / VVVV-KK (kuukauden loppuun mennessä) /
 AAAA-MM-JJ / AAAA-MM (MM = fin du mois) /
 JJJJ-MM-TT / JJJJ-MM (MM = Monatsende) /
 EEEE-MM-HH / EEEE-MM (MM = τέλος του μήνα) /
 ÉÉÉÉ-HH-NN / ÉÉÉÉ-HH (HH = hónap utolsó napja) /
 AAAA-MM-GG / AAAA-MM (MM = fine mese) /
 MMMM-MM-DD / MMMM-MM (MM = mēnesio pabaiga) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutten av måneden) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec miesiąca) /
 AAAA-MM-DD / AAAA-MM (MM = fim do mês) /
 RRRR-MM-DD / RRRR-MM (MM = koniec mesiac) /
 aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) /
 ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = края на месеца) /
 AAAA-LL-ZZ / AAAA-LL (LL = sfârșitul lunii) /
 YYYY-AA-GG / YYYY-AA (AA = ayın sonu) /
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj meseca) /
 ГГГГ-ММ-ДД / ГГГГ-ММ (ММ = конец месяца) /
 ЖЖЖЖ-АА-КК / ЖЖЖЖ-АА (АА = айдың соңы) /
 GGGG-MM-DD / GGGG-MM (MM = kraj mjeseca)



Catalog number / Katalogové číslo / Katalognummer / Catalogusnummer / Kataloogi number / Tuotenumero / Numéro catalogue / Bestellnummer / Αριθμός καταλόγου / Katalógusszám / Numero di catalogo / Katalogen numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo / Каталоген номер / Număr de catalog / Katalog numerasi / Kataloški broj / Номер по каталогу / Каталог нөмірі



Authorized Representative in the European Community / Autorizovaný zástupce pro Evropskou unii / Autoriseret repræsentant i EU / Erkend vertegenwoordiger in de Europese Unie / Volitatus esindaja Euroopa Nõukogus / Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Représentant agréé pour la C.E.E. / Autorisieret EG-Vertretung / Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα / Hivatalos képviselő az Európai Unióban / Rappresentante autorizzato nella Comunità europea / Įgaliojatis atstovas Europos Bendrijoje / Autoriseret representant i EU / Autorizowane przedstawicielstwo w Unii Europejskiej / Reprezentante autorizado na União Europeia / Autorizovaný zástupca v Európskom spoločenstve / Representante autorizado en la Comunidad Europea / Auktoriserad representant i EU / Оторизирани представител в EU / Repræsentant autorizat in Uniunea Europeană / Автура Топлулугу Yetkilii Temsilcisi / Ovlašćeni predstavnik u Evropskoj zajednici / Уполномоченный представитель в Европейском сообществе / Европа қауымдастығындағы уәкілетті өкіл / Autorizuirani predstavnik u EU



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk mediceinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostiska meditsiiniparatuur / Lääkinällinen in vitro -diagnostikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Mediciniska in-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnostikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicinska pomůcka na diagnostiku in vitro / Dispositivo médico de diagnóstico in vitro / Medicinsk anordning för in vitro-diagnostik / Медицински уред за диагностика ин витро / Aparatură medicală de diagnosticare in vitro / In Vitro Diagnostik Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / Medicinska pomagala za In Vitro Dijagnostiku



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrensning / Temperaturlimit / Temperaturi piirang / Lämpötilarajointu / Température limite / Zulässiger Temperaturenbereich / Όριο θερμοκρασίας / Hőmérsékleti határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrensning / Ograničenje temperature / Limitação da temperatura / Ochraničenie teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrensning / Температури ограничения / Limitare de temperatură / Sicaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch code (Lot) / Chargennummer (lot) / Partii kood / Eräkoodi (LOT) / Code de lot (Lot) / Chargencode (Chargenbezeichnung) / Κωδικός παρτίδας (Παρτίδα) / Tétel száma (Lot) / Codice del lotto (partita) / Partijos numeris (Lot) / Batch-kode (Serie) / Kod partii (serial) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Partii Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (лот) / Топтама коды / Lot (kod)



Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Indeholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Kullaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> testezhez elegendő / Contenido suficiente per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Inholder tilstrekkelig for <n> tester / Zawiera ilość wystarczającą do <n> testów / Contém suficiente para <n> testes / Obsah vystačí na <n> testov / Contenido suficiente para <n> pruebas / Räckertill <n> antal tester / Съдържа много е достатъчно за <n> теста / Conține suficient pentru <n> teste / <n> testleri için yeterli miktarda içerir / Sadržaj dovoljan za <n> testova / Достаточно для <n> тестов(а) / <n> тесттері үшін жеткілікті / Sadržaj za (n) testova



Consult Instructions for Use / Prostudujte pokyny k použití / Læs brugsanvisningen / Raadpleeg gebruiksaanwijzing / Lugeda kasutusjuhendit / Tarkista käyttöohjeista / Consulter la notice d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης / Olvassa el a használati utasítást / Consultare le istruzioni per l'uso / Skaitykite naudojimo instrukcijas / Se i bruksanvisningen / Zobacz instrukcja użytkowania / Consulte as instruções de utilização / Pozri Pokyny na používanie / Consultar las instrucciones de uso / Se bruksanvisningen / Направете справка в инструкциите за употреба / Consultați instrucțiunile de utilizare / Kullanım Talimatları'na başvurun / Pogledajte uputstvo za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi upute za upotrebu



Negative control / Negativní kontrola / Negativ kontrol / Negatieve controle / Negatiivne kontroll / Negatiivkontrolli / Contrôle négatif / Negative Kontrolle / Αρνητικός έλεγχος / Negatív kontroll / Controllo negativo / Neigiama kontrolė / Negativ kontroll / Kontrola ujemna / Controllo negativo / Negatívna kontrola / Control negativo / Отрицателен контрол / Etalon negativ / Negatif kontrol / Negativna kontrola / Отрицательный контроль / Негативтік бақылау



Positive control / Pozitivní kontrola / Positiv kontrol / Positieve controle / Positiivne kontroll / Positiivkontrolli / Contrôle positif / Positive Kontrolle / Θετικός έλεγχος / Pozitiv kontroll / Controllo positivo / Teigiama kontrolė / Positiv kontroll / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Pozitívna kontrola / Control positivo / Положителен контрол / Etalon pozitiv / Pozitif kontrol / Pozitívna kontrola / Положительный контроль / Жатымды бақылау



Caution, consult accompanying documents / Pozor! Prostudujte si příloženou dokumentaci! / Forsigtig, læs ledsagende dokumenter / Let op: raadpleeg bijgeleverde documenten / Ettevaatust! Lugeda kaasnevat dokumentatsiooni / Huomio, lue oheiset asiakirjat / Attention, consulter les documents joints / Achtung, Begleitdokumente beachten / Προσοχή, συμβουλευτείτε τα συνοδευτικά έγγραφα / Figyelem! Olvassa el a mellékelt tájékoztatót / Attenzione: consultare la documentazione allegata / Dèmesio, ziurėkite pridedamus dokumentus / Forsiktig, se vedlagt dokumentasjon / Należy zapoznać się z dołączonymi dokumentami / Cuidado, consulte a documentação fornecida / Výstraha, pozri sprievodné dokumenty / Precaución, consultar la documentación adjunta / Förvarning, se bifogade dokument / Внимание, направете справка в придружаващите документи / Atenție, a se consulta documentele însoțitoare / Dikkat, birlikte verilen belgeleri başvurun / Pažnja! Pogledajte priložena dokumenta / Внимание: см. прилагаемую документацию / Абайлаңыз, тиісті құжаттармен танысыңыз / Urozorenje, koristi prateću dokumentaciju



Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, MD 21152 USA
(800) 638-8663
www.bd.com/ds



Benex Limited
Rineanna House
Shannon Free Zone
Shannon, County Clare, Ireland