

### Revisions

Rev from	Rev to	ECO #
0208	2010/07	5182-09

**Notes:**

1. BD Cat. Number Various
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



4. See Specification Control Number BALT0216647 for Material Information
5. Ink Colors: Printed two sides  Yes       No  
 No. of Colors: 1      PMS# 2755
6. Graphics are approved by Becton, Dickinson and Company. Supplier has the responsibility for using the most current approved revision level.

Label Design	Date	<p style="font-size: small;">COMPANY CONFIDENTIAL. THIS DOCUMENT IS THE PROPERTY OF BECTON, DICKINSON AND COMPANY AND IS NOT TO BE USED OUTSIDE THE COMPANY WITHOUT WRITTEN PERMISSION</p> <p style="font-weight: bold; font-size: large;">BD</p> <p>Becton, Dickinson and Company 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152 USA</p>	<p>Category and Description</p> <p>Package Insert, Directigen Meningitis Individual Tests</p>		Sheet: 1 of 37	A
Proofer	Date				Scale: N/A	
Checked By	Date		<p>Part Number:</p> <p style="font-size: 1.2em;">0216647JAA</p>			

## Meningitis Individual Tests

For the detection of *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, Group B *Streptococcus* or *Neisseria meningitidis* Group B / *Escherichia coli* K1.

English:	pages	1 – 6	Italiano	pagine	17 – 22
Français:	pages	7 – 12	Español:	páginas	22 – 27
Deutsch	Seiten	12 – 17	Tables:	pages	28 – 30
			Procedural Chart	page	31



0216647JAA  
2010/07

Pokyny vám poskytnú 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 för anvisningar. / Свържете се с местния представител на BD за инструкции. / Contactați reprezentantul dumneavoastră local BD pentru instrucțiuni. / Talimatlar için yerel BD temsilcilerinize danın. / Obratite se svom lokalnom predstavniku kompanije BD za uputstva. / Для получения инструкций свяжитесь с местным представителем компании BD. / Өзіндік жергілікті BD өкіліне жүгініп нұсқау алыңыз. / Kontaktiraj lokalnog predstavnika BD za upute.

### INTENDED USE

The **Directigen™** Meningitis Individual Tests are presumptive latex slide agglutination tests for the direct qualitative detection of antigens to *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* Group B 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* Group B. 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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

*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.<sup>3</sup>

Group B *Streptococcus* and *Escherichia coli* K1 are major bacterial pathogens in the newborn.<sup>4-7</sup> 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.<sup>8</sup> The *E. coli* K1 polysaccharide antigen has been shown to be structurally and immunologically similar to *Neisseria meningitidis* Group B antigen.<sup>9,10</sup> 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.<sup>4</sup>

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.<sup>11-14</sup> The latex agglutination procedure has been found to be more rapid and sensitive than CIE in the detection of purified antigen.<sup>15-17</sup>

### 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*, *N. meningitidis* Groups A,B,C,Y or W135 and *Escherichia coli* K1; and in CSF or serum as a result of infection by Group B *Streptococcus*. These antigens can be detected with the **Directigen** Meningitis Combo Test Kit or the Meningitis Individual Kits (see "Availability").

## REAGENTS

### Directigen Meningitis Individual Tests:

#### *Haemophilus influenzae* type b:

<b>Reagent 1</b>	(1.0 mL),	Anti- <i>H. influenzae</i> type b Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
<b>Reagent A</b>	(0.5 mL),	Control Latex, Rabbit Immunoglobulin-Coated Latex Suspension, each with 0.2% sodium azide (preservative).
<b>Control +</b>	(1.5 mL),	Polyvalent Positive Antigen Control, Group B <i>Streptococcus</i> , <i>N. meningitidis</i> Groups A, C, Y and W135, <i>H. influenzae</i> type b and <i>S. pneumoniae</i> antigens,
<b>Control –</b>	(1.5 mL),	Negative Antigen Control, glycine buffered saline, each with 0.2% sodium azide (preservative).

#### *Streptococcus pneumoniae*:

<b>Reagent 1</b>	(1.0 mL),	Anti- <i>S. pneumoniae</i> Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
<b>Reagent A</b>	(0.5 mL),	Control Latex, Rabbit Immunoglobulin-Coated Latex Suspension, each with 0.2% sodium azide (preservative).
<b>Control +</b>	(1.5 mL),	Polyvalent Positive Antigen Control, <i>N. meningitidis</i> Groups A, C, Y and W135, <i>H. influenzae</i> type b and <i>S. pneumoniae</i> antigens,
<b>Control –</b>	(1.5 mL),	Negative Antigen Control, glycine buffered saline, each with 0.2% sodium azide (preservative).

#### Group B *Streptococcus*:

<b>Reagent 1</b>	(1.0 mL),	Anti-Group B <i>Streptococcus</i> Rabbit Polyclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
<b>Reagent A</b>	(0.5 mL),	Control Latex, Rabbit Immunoglobulin-Coated Latex Suspension, each with 0.2% sodium azide (preservative).
<b>Control +</b>	(1.5 mL),	Polyvalent Positive Antigen Control, Group B <i>Streptococcus</i> , <i>N. meningitidis</i> Groups A, C, Y and W135, <i>H. influenzae</i> type b and <i>S. pneumoniae</i> antigens,
<b>Control –</b>	(1.5 mL),	Negative Antigen Control, glycine buffered saline, each with 0.2% sodium azide (preservative).

#### *Neisseria meningitidis* Group B / *E. coli* K1:

<b>Reagent 1</b>	(1.0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> Group B / <i>E. coli</i> K1 Mouse Monoclonal Antibody-Coated Latex Suspension,
<b>Reagent A</b>	(0.5 mL),	Control Latex, Mouse Immunoglobulin-Coated Latex Suspension, each with 0.2% sodium azide (preservative).
<b>Control +</b>	(1.5 mL),	Polyvalent Positive Antigen Control, <i>N. meningitidis</i> Groups A, B, C, Y and W135, <i>H. influenzae</i> type b, Group B <i>Streptococcus</i> and <i>S. pneumoniae</i> antigens,
<b>Control –</b>	(1.5 mL),	Negative Antigen Control, glycine buffered saline, each with 0.2% sodium azide (preservative).

### Precautions: For *in vitro* Diagnostic Use.

Pathogenic microorganisms, including hepatitis viruses and Human Immunodeficiency Virus, may be present in clinical specimens. "Standard Precautions" <sup>18–21</sup> 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 expiration date. Upon removal from the refrigerator, allow the 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 the test areas, since this may result in an oily deposit and improper test results. Use each card once and discard. Store cards in the original package in a dry area at room temperature. When spreading within confines of test areas, avoid scratching the card surface with the plastic stirrers. If the specimen does not spread to the 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 – 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 the 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 pretreatment. 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, all 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 and accessories.

**Materials Required But Not Provided:** **Directigen** Meningitis Combo Test Cards, **Directigen** Specimen Buffer, Rotator, 100 ± 2 rpm, Humidifying cover, Micropipettor, 50 µL delivery, 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. When testing CSF specimens for *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae* and Group B *Streptococcus*, 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 / *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 specimen (heated or unheated, as appropriate) as described in "Test Procedure."

#### Specimen Preparation (Serum):

1. Dilute serum 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. 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, USA).
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 a 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 the reagents from refrigerated storage and slide the reagent tray into the slot in the kit Work Station.

**Refer to Procedural Chart Illustrations, page 31.**

The Meningitis Combo test card or glass slide may be used to test samples. If using the Meningitis Combo card for more than one sample, label circles appropriately. Before use of the glass slide, thoroughly clean with a lint-free tissue.

1. Dispense one drop of **Control +** onto the circle corresponding to Reagent 1 of row "+." Place one drop of **Control -** onto the circle corresponding to Reagent 1 of row "-."
2. Micropipette 50 µL of test sample onto the circle corresponding to Reagent 1 of row "S" and circle A.
3. Holding the dispensing bottle by the cap, vigorously swing (without inverting) to thoroughly mix each reagent. Before uncapping the bottle, gently tap the base on the counter top to assure no latex remains in the tip.
4. Dispense one drop of **Reagent A** (Control Latex Suspension) onto circle A.
5. Dispense one drop of **Reagent 1** onto the circles "+," "-" and "S" in the column corresponding to Reagent 1.
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.

#### **INTERPRETATION OF TEST RESULTS**

Record **Control +** and **Control -** test results first.

The **Control +** should yield agglutination with **Reagent 1** within 10 min. The **Control -** should show no agglutination. Agglutination in the circle containing **Reagent A** renders the reaction uninterpretable.

Record patient test results:

**Positive Test** – Should show agglutination with **Reagent 1**. Any degree of agglutination with **Reagent 1** indicates the presence of the corresponding antigen. *Agglutination of Reagent A renders the reaction uninterpretable.*

**Negative Test** – Should show no agglutination with **Reagent 1** or **Reagent A**.

#### **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 and should be routinely performed. 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* group B, 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, Group B *Streptococcus*, *S. pneumoniae*, and *N. meningitidis* Group B. Performance with other specimen types has not been assessed.

The **Directigen** Meningitis Individual Tests 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 *H. 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. *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 urine specimens may yield uninterpretable results with the latex reagents. See "PROCEDURES – Specimen Preparation." CSF specimens or treated urine specimens showing any degree of turbidity should be centrifuged for 10 min at 1400 x g 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" yielding uninterpretable or suspected false positive results may be filtered using a MILLIPORE™ MilllexHA 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 organism in infants presenting with fever without localizing signs.<sup>22</sup> 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 antigen depends on the patient and the type of vaccines given. Patient vaccination history is important for the correct interpretation of positive urinary Hib antigen results in vaccinated infants.<sup>22-24</sup>

Cross reactions have been produced by some strains of the viridans streptococci group (i.e. *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)<sup>25</sup> 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.<sup>3</sup>

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Sensitivity:** In a retrospective clinical evaluation, 177 cerebrospinal fluids (heated and unheated), 31 serum, and 40 urine specimens were tested by the **Directigen** Meningitis latex reagents and counterimmunoelectrophoresis (CIE) (Table 1, see page 28). The 248 specimens tested were originally derived from patients with culture or CIE confirmed cases of either *Haemophilus influenzae* type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* Group B or Group B streptococcal infection.

*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** *Neisseria meningitidis* Group B Latex (Reagent 1) could detect *E. coli* K1 in CSF (4/4), sera (4/4), urine (3/4) and concentrated urine (4/4). The endpoint sensitivities were equal to or better than those observed with another commercially available latex reagent.<sup>15</sup>

The **Directigen** Meningitis latex reagents were equal to, or more sensitive than CIE in detecting antigen in CSF, serum and urine specimens.

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

Additionally, a retrospective study was performed on CSF (heated and unheated) and urine specimens from patients with culture confirmed Group B streptococcal infection. **Directigen** detected antigen in seven of eight CSF specimens, 22 of 25 unconcentrated urine specimens, and ten of ten 25-fold concentrated urine specimens.

**Specificity:** The specificity of the **Directigen** Meningitis reagents was determined by testing prospective CSF, serum and urine specimens in clinical studies conducted at five institutions (Table 2, see page 29). 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 page 30).

#### AVAILABILITY

##### Cat. No. Description

**Directigen™** Kits:

252260 *H. influenzae* type b Test Kit, (30 patient tests, 60 controls).

251960 *S. pneumoniae* Test Kit, (30 patient tests, 60 controls).

255460 Group B Strep Test Kit, (30 patient tests, 60 controls).

255560 *N. meningitidis* Group B/*E. coli* K1 Test Kit, (30 patient tests, 60 controls).

250160 *N. meningitidis* Groups A, C, Y and W135 Test Kit, (30 patient tests, 60 controls).

252360 Meningitis Combo Test Kit, (30 patient tests, 60 controls).

252480 **Directigen™** Meningitis Combo Test Card (single use), Box 30.

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-51-1L.

## 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.* 27:146–152, 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*, 6th 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., Gloche, 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. Lively, M.R., A.S. Gilbert and C. Moreno: 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.: Countercurrent immunoelectrophoresis in the diagnosis of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b., *J. Ped.*, 81:1156–1159, 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 counterimmuno-electrophoresis 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) 5<sup>th</sup> 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; 10:557–9.
23. Goepf, 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; 10:331–14.
25. Holmberg, H., Danielsson D, Hardie, J., Krook, A., Whiley, R.: Cross-reactions between  $\alpha$ -streptococci and omniserum, a polyvalent pneumococcal serum, demonstrated by direct immunofluorescence, immunoelectrophoresis, and latex agglutination, *J. Clin Microbiol.*, 21:745–748, 1985.

## Meningitis Individual Tests

Pour la détection de *Haemophilus influenzae* de type b, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* de groupe B ou *Neisseria meningitidis* de groupe B / *Escherichia coli* K1.

Français

### APPLICATION

Les tests Meningitis individuels **Directigen** sont des tests de présomption utilisant une technique d'agglutination de particules de latex sur lame pour la détection qualitative directe d'antigènes de *H. influenzae* de type b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* de groupe B 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 trousse diagnostique permet de confirmer la présence et le sérotype des colonies présumées de *H. influenzae* de type b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* du groupe B et *N. meningitidis* du groupe B. 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.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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

*Streptococcus* de groupe B et *Escherichia coli* K1 sont les principaux agents pathogènes bactériens chez le nouveau-né.<sup>4-7</sup> 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.<sup>8</sup> Il a été démontré que l'antigène polysaccharidique de *E. coli* K1 est structurellement et immunologiquement similaire à celui de *Neisseria meningitidis* du groupe B.<sup>9,10</sup> 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.<sup>4</sup>

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.<sup>11-14</sup> La méthode d'agglutination de latex s'est avérée plus rapide et plus sensible que la CIE pour la détection d'un antigène purifié.<sup>15-17</sup>

### 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 ou le sérum, à la suite d'une infection à *Streptococcus* de groupe B. Ces antigènes peuvent être détectés avec la trousse diagnostique Meningitis Combo **Directigen** ou les troupes Meningitis individuelles (voir « Conditionnement »).

### REACTIFS

Tests Meningitis individuels **Directigen** :

#### *Haemophilus influenzae* de type b :

Réactif 1	(1,0 mL),	Suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin anti- <i>H. influenzae</i> de type b,
Réactif A	(0,5 mL),	Latex de contrôle, suspension de latex recouvert d'immunoglobulines de lapin – chaque réactif contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).
Contrôle +	(1,5 mL),	Contrôle antigène positif polyvalent, antigènes de <i>Streptococcus</i> de groupe B, <i>N. meningitidis</i> des groupes A, C, Y et W135, <i>H. influenzae</i> de type b et <i>S. pneumoniae</i> ,
Contrôle –	(1,5 mL),	Contrôle antigène négatif, sérum physiologique tamponné à la glycine – chaque contrôle contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).

#### *Streptococcus pneumoniae* :

Réactif 1	(1,0 mL),	Suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin anti- <i>S. pneumoniae</i> ,
Réactif A	(0,5 mL),	Latex de contrôle, suspension de latex recouvert d'immunoglobulines de lapin – chaque réactif contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).
Contrôle +	(1,5 mL),	Contrôle antigène positif polyvalent, antigènes de <i>Streptococcus</i> de groupe B, <i>N. meningitidis</i> des groupes A, C, Y et W135, <i>H. influenzae</i> de type b et <i>S. pneumoniae</i> ,
Contrôle –	(1,5 mL),	Contrôle antigène négatif, sérum physiologique tamponné à la glycine – chaque contrôle contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).

### **Streptococcus de groupe B :**

<b>Réactif 1</b>	(1,0 mL),	Suspension de latex recouvert d'anticorps polyclonaux de lapin anti- <i>Streptococcus</i> du groupe B,
<b>Réactif A</b>	(0,5 mL),	Latex de contrôle, suspension de latex recouvert d'immunoglobulines de lapin – chaque réactif contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).
<b>Contrôle +</b>	(1,5 mL),	Contrôle antigène positif polyvalent, antigènes de <i>Streptococcus</i> de groupe B, <i>N. meningitidis</i> des groupes A, C, Y et W135, <i>H. influenzae</i> de type b et <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Contrôle –</b>	(1,5 mL),	Contrôle antigène négatif, sérum physiologique tamponné à la glycine – chaque contrôle contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).

### **Neisseria meningitidis du groupe B / E. coli K1 :**

<b>Réactif 1</b>	(1,0 mL),	Suspension de latex recouvert d'anticorps monoclonaux de souris anti- <i>N. meningitidis</i> du groupe B et anti- <i>E. coli</i> K1,
<b>Réactif A</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).
<b>Contrôle +</b>	(1,5 mL),	Contrôle antigène positif polyvalent, antigènes de <i>N. meningitidis</i> des groupes A, B, C, Y et W135, <i>H. influenzae</i> de type b, <i>Streptococcus</i> de groupe B et <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Contrôle –</b>	(1,5 mL),	Contrôle antigène négatif, sérum physiologique tamponné à la glycine – chaque contrôle contenant 0,2 % d'azide de sodium (agent conservateur).

### **Précautions : Réservé au diagnostic *in vitro*.**

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 »<sup>18-21</sup> 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 bonne distribution goutte à goutte, 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. N'utiliser chaque carte qu'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'étagage aux confins des zones de test, éviter de gratter la surface de la carte avec les agitateurs 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 rpm 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) constitue le moyen le plus efficace de pré-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** : Cartes de test Meningitis Combo **Directigen**, tampon échantillon **Directigen**, agitateur rotatif, 100 ± 2 rpm, couvercle humidificateur, micropipette, distribution de 50 µL, embouts de pipette

} (voir « Conditionnement »)

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. Pour tester la présence de *H. influenzae* de type b, de *S. pneumoniae* et de *Streptococcus* de groupe B dans le LCR, chauffer les échantillons pendant 3 min à 100 °C (p. ex., bain-marie ou bloc chauffant) et laisser refroidir jusqu'à température ambiante avant l'emploi.  
Pour une sensibilité optimale, le dépistage de *N. meningitidis* du groupe B / *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 l'échantillon (chauffé ou non chauffé, comme il convient) comme indiqué au paragraphe « Mode opératoire du test ».

#### Préparation des échantillons (sérum) :

1. Diluer, à parts égales, les échantillons sériques (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. 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 emenceuseur 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 un **Contrôle +** et un **Contrôle –** 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) :

Sortir les réactifs du réfrigérateur et engager le plateau à réactifs dans le logement du poste de travail de la trousse.

### Consulter le tableau de procédure à la page 31.

La carte de test ou la lame en verre Meningitis Combo test peut servir à tester les échantillons. Si la carte Meningitis Combo sert pour plus d'un échantillon, veuillez étiqueter les zones de test de manière appropriée. Nettoyer complètement la lame en verre avec un tissu non pelucheux avant de l'utiliser.

1. Déposer une goutte de **Contrôle +** dans la zone de test correspondant au Réactif 1 de la rangée « + ». Déposer une goutte de **Contrôle -** dans la zone de test correspondant au Réactif 1 de la rangée « - ».
2. A l'aide d'une micropipette, déposer 50 µL de l'échantillon à tester sur la zone correspondant au Réactif 1 de la rangée « S » et de la zone A.
3. Saisir le flacon compte-gouttes par le bouchon et agiter vigoureusement (sans inverser le flacon) pour bien mélanger chaque réactif. Avant de déboucher le flacon, tapoter délicatement le fond du flacon contre le plan de travail pour faire tomber le réactif au latex éventuellement retenu dans l'embout.
4. Déposer une goutte de **Réactif A** (suspension de latex de contrôle) dans la zone de test A.
5. Déposer une goutte de **Réactif 1** dans les zones de test « + », « - » et « S » de la colonne correspondant au Réactif 1.
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 de test 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  $100 \pm 2$  rpm.
8. A l'issue des 10 minutes, lire immédiatement les résultats du test par observation macroscopique sous une lampe à incandescence à forte intensité.

### INTERPRETATION DES RESULTATS DU TEST

Lire d'abord les résultats de test du **Contrôle +** et du **Contrôle -**.

Le **Contrôle +** doit produire une agglutination avec le **Réactif 1** dans les 10 minutes qui suivent. Le **Contrôle -** ne doit présenter aucune trace d'agglutination.

Toute agglutination dans la zone de test contenant le **Réactif A** rend la réaction ininterprétable.

Lire les résultats de test des échantillons cliniques :

**Test positif** – Doit montrer une agglutination avec le **Réactif 1**. Tout degré d'agglutination avec le **Réactif 1** indique la présence de l'antigène correspondant. *Toute agglutination avec le Réactif A rend la réaction ininterprétable.*

**Test négatif** – Ne doit produire aucune agglutination avec le **Réactif 1** ou le **Réactif A**.

### 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 et devrait être effectué en routine.

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 échantillonsensemencés 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 B et *E. coli* K1 dans le LCR, le sérum ou l'urine et *Streptococcus* du groupe B dans le LCR et le sérum. La trousse diagnostique peut également être utilisée avec les colonies suspectes de *H. influenzae* de type b, *Streptococcus* du groupe B, *S. pneumoniae* et *N. meningitidis* du groupe B. Les performances du test avec d'autres types d'échantillon n'ont pas été évaluées.

Les tests Meningitis individuels **Directigen** ne peuvent pas être utilisés 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'*H. 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. 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 OPERATOIRES – 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.

Les réactifs au latex peuvent donner des résultats non interprétables avec des échantillons de sérum et d'urine non traités. Voir « MODES OPERATOIRES – Préparation des échantillons ». Les échantillons de LCR ou les échantillons d'urine traités 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 OPERATOIRES – Préparation des échantillons ») donnant des résultats ininterprétables ou suspects d'être de faux positifs peuvent être filtrés sur filtre MILLIPORE MillexHA 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.<sup>22</sup> 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 de vaccins administrés. Les antécédents de vaccination sont importants pour une interprétation exacte des résultats urinaires positifs Hib chez des nouveau-nés vaccinés.<sup>22-24</sup>

Certaines souches du groupe *S. viridans* (c.-à-d., *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)<sup>25</sup> 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 méningite bactérienne.<sup>3</sup>

#### CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

**Sensibilité** : Au cours d'une évaluation clinique rétrospective, 177 échantillons de liquide céphalorachidien (chauffés et non chauffés), 31 échantillons de sérum et 40 échantillons d'urine ont été analysés en utilisant les réactifs au latex Meningitis **Directigen** et l'électrosynérèse (CIE) (voir **tableau 1, page 28**). Les 248 échantillons analysés provenaient de patients chez lesquels une infection soit par *Haemophilus influenzae* de type b, soit par *Streptococcus pneumoniae*, soit par *Neisseria meningitidis* du groupe B ou par streptocoques du groupe B avait été confirmée par culture ou électrosynérèse (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 (**Réactif 1**) a permis la détection de *E. coli* K1 dans le LCR (4/4), le sérum (4/4), l'urine (3/4) et l'urine concentrée (4/4). Les sensibilités étaient équivalentes ou supérieures à celles observées avec un réactif au latex similaire disponible sur le marché.<sup>15</sup>

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.

Chaque réactif au latex **Directigen** a également été comparé à l'électrosynérèse en ce qui concerne ses possibilités de détection d'antigènes partiellement purifiés, inoculés dans du LCR, du sérum et de l'urine. 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.<sup>15</sup>

En outre, une étude rétrospective a été effectuée sur des échantillons de LCR (chauffés et non chauffés) et d'urine de patients dont l'infection par streptocoques de groupe B a été confirmée par mise en culture. **Directigen** a détecté les antigènes dans sept des huit échantillons de LCR, 22 des 25 échantillons d'urine non concentrée et dix échantillons sur dix d'urine concentrée 25 fois.

**Spécificité** : La spécificité des réactifs Meningitis **Directigen** a été déterminée par analyse prospective d'échantillons de LCR, de sérum, d'urine et d'urine au cours d'études cliniques menées dans cinq centres investigateurs (voir **tableau 2, page 29**). 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 30)**.

## CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
252260	Trousse <b>Directigen</b> : Trousse diagnostique pour <i>H. influenzae</i> de type b – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
251960	Trousse diagnostique pour <i>S. pneumoniae</i> – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
255460	Trousse diagnostique pour strep. du groupe B – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
255560	Trousse diagnostique pour <i>N. meningitidis</i> du groupe B / <i>E. coli</i> K1 – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
250160	Trousse diagnostique pour <i>N. meningitidis</i> des groupes A, C, Y et W135 – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
252360	Trousse diagnostique Meningitis Combo – 30 tests cliniques, 60 contrôles.
252480	<b>Directigen</b> Meningitis Combo Test – carte (usage unique), boîte de 30.
256391	Tampon échantillon <b>Directigen</b> , 8 mL.
252350	Réactif de contrôle négatif Meningitis <b>Directigen</b> , 9 mL, boîte de 4.
278051	Agitateur rotatif de test sur carte <b>Macro-Vue</b> (avec protège-carte humidificateur), 100 ± 2 rpm, minuterie automatique, entraînement à friction, modèle 51-11.

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

## **BD Directigen** **Meningitis Individual Tests**

Zum Nachweis von *Haemophilus influenzae* Typ B, *Streptococcus pneumoniae*, Streptokokken Gruppe B, *Neisseria meningitidis* Gruppe B und *Escherichia coli* K1.

Deutsch

### VERWENDUNGSZWECK

**Directigen**-Meningitis-Einzeltests sind präsumtive Latex-Agglutinationstests für den direkten qualitativen Nachweis von Antigenen gegen *H. influenzae* Typ B, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* Gruppe B und *Escherichia coli* K1 in Rückenmarksflüssigkeit (Liquor), im Serum oder im 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 die Möglichkeit der Bestätigung und der Serogruppierung von vermuteten Kolonien von *H. influenzae* Typ B, *S. pneumoniae*, Streptokokken der Gruppe B und *N. meningitidis* Gruppe B. 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.<sup>1</sup> Der Nachweis der bakteriellen Antigene in der Rückenmarksflüssigkeit ist ein schnelles und nützliches Verfahren der mikrobiologischen Diagnostik. Dieses Verfahren könnte in Fällen teilweise therapiertener 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.<sup>2</sup>

*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.<sup>3</sup>

*Streptococcus* der Gruppe B und *Escherichia coli* K1 sind bedeutsame bakterielle Pathogene bei Neugeborenen.<sup>4-7</sup> 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.<sup>8</sup> Das Polysaccharid-Antigen von *E. coli* K1 erwies sich als dem Antigen von *Neisseria meningitidis* Gruppe B strukturell und immunologisch ähnlich.<sup>9,10</sup> 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.<sup>4</sup>

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.<sup>11-14</sup> Es hat sich herausgestellt, daß die Latex-Agglutination einen schnelleren und empfindlicheren Nachweis des purifizierten Antigens zuläßt, als CIE.<sup>15-17</sup>

### VERFAHENSGRUNDLAGEN

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*, *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 oder mit den Meningitis-Einzeltestkits nachweisen (siehe „Bezugsdaten“).

## REAGENZIEN

### Directigen-Meningitis-Einzeltests:

#### *Haemophilus influenzae* Typ B:

<b>Reagenz 1</b>	(1,0 mL),	Mit polyklonalen Antikörpern des Kaninchens gegen <i>H. influenzae</i> Typ B beschichtete Latexsuspension,
<b>Reagenz A</b>	(0,5 mL),	Kontroll-Latex, mit Kaninchen-Immunglobulin beschichtete Latexsuspension mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).
<b>Kontrolle +</b>	(1,5 mL),	Polyvalente, positive Antigenkontrolle, Antigene gegen <i>Streptococcus</i> Gruppe B, <i>N. meningitidis</i> Gruppe A, C, Y und W135, <i>H. influenzae</i> Typ B und <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Kontrolle –</b>	(1,5 mL),	Negative Antigen-Kontrolle, glyzinegepufferte Kochsalzlösung mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).

#### *Streptococcus pneumoniae*:

<b>Reagenz 1</b>	(1,0 mL),	Mit polyklonalen Antikörpern des Kaninchens gegen <i>S. pneumoniae</i> beschichtete Latexsuspension,
<b>Reagenz A</b>	(0,5 mL),	Kontroll-Latex, mit Kaninchen-Immunglobulin beschichtete Latexsuspension mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).
<b>Kontrolle +</b>	(1,5 mL),	Polyvalente, positive Antigenkontrolle, Antigen gegen <i>Streptococcus</i> Gruppe B, Antigene gegen <i>N. meningitidis</i> Gruppe A, C, Y und W135, <i>H. influenzae</i> Typ B und <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Kontrolle –</b>	(1,5 mL),	Negative Antigen-Kontrolle, glyzinegepufferte Kochsalzlösung mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).

#### *Streptococcus* Gruppe B:

<b>Reagenz 1</b>	(1,0 mL),	Mit polyklonalen Antikörpern des Kaninchens gegen <i>Streptococcus</i> der Gruppe B beschichtete Latexsuspension,
<b>Reagenz A</b>	(0,5 mL),	Kontroll-Latex, mit Kaninchen-Immunglobulin beschichtete Latexsuspension mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).
<b>Kontrolle +</b>	(1,5 mL),	Polyvalente, positive Antigenkontrolle, Antigene gegen <i>Streptococcus</i> Gruppe B, <i>N. meningitidis</i> Gruppe A, C, Y und W135, <i>H. influenzae</i> Typ B und <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Kontrolle –</b>	(1,5 mL),	Negative Antigen-Kontrolle, glyzinegepufferte Kochsalzlösung mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).

#### *Neisseria meningitidis* Gruppe B / *E. coli* K1:

<b>Reagenz 1</b>	(1,0 mL),	Mit monoklonalen Antikörpern der Maus gegen <i>N. meningitidis</i> Gruppe B und <i>E. coli</i> K1 beschichtete Latexsuspension,
<b>Reagenz A</b>	(0,5 mL),	Kontroll-Latex, mit Maus-Immunglobulin beschichtete Latexsuspension mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).
<b>Kontrolle +</b>	(1,5 mL),	Polyvalente, positive Antigenkontrolle, Antigene gegen <i>N. meningitidis</i> Gruppe A, B, C, Y und W135, <i>H. influenzae</i> Typ B, <i>Streptococcus</i> Gruppe B und <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Kontrolle –</b>	(1,5 mL),	Negative Antigen-Kontrolle, glyzinegepufferte Kochsalzlösung mit jeweils 0,2 % Natriumazid (Konservierungsmittel).

#### Sicherheitshinweise: *In-vitro*-Diagnostikum.

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“<sup>18-21</sup> sowie die einschlägigen Institutionsrichtlinien zu beachten. Nach Gebrauch Probenbehälter und andere kontaminierte Materialien im Autoklaven sterilisieren und erst dann entsorgen.

**Reagenzien:** Nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden. Nach der Entnahme aus dem Kühlschrank Reagenzien vor Verwendung Raumtemperatur (15 – 30 °C) erreichen lassen.

Zur Entnahme der korrekten Tropfenmenge muß das Reagenzfläschchen senkrecht gehalten werden, so daß die Tropfen einzeln und frei nach unten fallen.

**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. Die Testfelder auf keinen Fall mit den Fingern berühren, da hierbei Hautfett abgelagert werden kann, das die Testergebnisse verfälscht. Jede Testkarte nur einmal verwenden und danach verwerfen. Testkarten in der Originalverpackung bei Zimmertemperatur in einem trockenen Bereich lagern. Beim Ausstreichen innerhalb der Testfelder die Oberfläche der Karte nicht mit den Kunststoffspateln verkratzen. Wenn sich die Probe nicht bis in den Randbereich des Testfeldes ausstreichen läßt, ein anderes Testfeld auf der Karte verwenden.

**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 Drehzahl des mechanischen Rotators beträgt 100 ± 2 U/min, doch wird das Ergebnis durch Drehzahlen zwischen 95 und 110 U/min nicht nennenswert beeinflusst. 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.

#### PROBENTNAHME UND -HANDHABUNG

Bezüglich Einzelheiten der Probenahme 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 Stunden lang) oder bei -20 °C tiefgekühlt aufbewahrt werden.

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

#### PROBENVORBEHANDLUNG

Das Einstellen verschlossener Reagenzgläser aus Glas (Borsilikat) ins Wasserbad bei 100 °C (kochendes Wasser) ist die wirksamste Art der Vorbehandlung von Proben. 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

Testbereich, Proben und Testkomponenten sollten bei Durchführung des Tests alle Raumtemperatur (15 – 30 °C) haben.

**Mitgelieferte Materialien:** Alle Materialien, wie unter „Reagenzien“ aufgeführt, Arbeitsstation und übliche Laborgeräte und -utensilien.

**Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Materialien:** Directigen-Meningitis-Combo-Testkarten, Directigen-Probenpufferlösung, Rotator für 100 ± 2 U/min, Verdunstungsschutzdeckel, Mikropipette für 50 µL Abgabe, Pipettenspitzen } (siehe „Bezugsdaten“)

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

#### Probenvorbereitung (Rückenmarksflüssigkeit):

1. Beim Testen von Rückenmarksflüssigkeit auf *H. influenzae* Typ B, *S. pneumoniae* und *Streptococcus* Gruppe B die Proben 3 Minuten lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.  
Um eine möglichst große Empfindlichkeit zu erreichen, sollten Tests auf *N. meningitidis* Gruppe B und *E. coli* K1 an nicht erhitzten Proben durchgeführt werden (siehe „Grenzen des Verfahrens“).
2. Trübe Proben der Rückenmarksflüssigkeit zwischen Erhitzung und Test 10 Minuten lang bei 1400 g zentrifugieren. Getestet wird dann der Flüssigkeitsüberstand.
3. Die Probe (je nach den Umständen erhitzt oder unerhitzt) wie im Abschnitt „Testdurchführung“ beschrieben testen.

#### Probenvorbereitung (Serum):

1. Serumproben von mindestens 0,4 mL im Verhältnis 1:1 mit Directigen-Probenpuffer verdünnen und mischen.
2. Proben 5 Minuten lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
3. Mit einem Holzspatel den Proteinklumpen, der sich dabei gebildet hat, zerteilen und kräftig im Vortexmischer mischen (etwa 5 Sekunden lang).
4. 15 Minuten 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 Minuten lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
3. 10 Minuten lang bei mindestens 1400 g zentrifugieren.
4. Überstand wie im Abschnitt „Testdurchführung“ beschrieben testen.

#### Probenvorbereitung (konzentrierter Urin):

1. Trübe oder Schwebstoffe enthaltende Urinproben vor dem Konzentrieren 10 Minuten lang bei 1400 g zentrifugieren.
2. Die Urinproben können mit einem Minicon-B-15-Konzentrator (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts, USA) um den Faktor 25 konzentriert werden.
3. Mindestens 200 µL Urinkonzentrat im Verhältnis 1:1 mit Directigen-Probenpuffer verdünnen und mischen.
4. Proben 5 Minuten lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterbearbeiten auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
5. 10 Minuten 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) Kontrolle – 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 erwähnten 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 Minuten lang bei 100 °C erhitzen (z.B. im Wasserbad oder in einem Reaktionsblock) und dann vor dem Weiterverwenden auf Raumtemperatur abkühlen lassen.
5. 10 Minuten lang bei mindestens 1400 g zentrifugieren.
6. Überstand wie im Abschnitt „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 entnehmen und Reagenztray in den Einschub der Arbeitsstation für das Kit einschieben.

**Siehe Abbildungen zur Testdurchführung, Ausklappdiagramm auf Seite 31.**

Die Meningitis-Combo-Testkarte oder -Testplatte können zum Testen von Proben verwendet werden. Wenn Sie die Meningitis-Combo-Testkarte für mehr als eine Probe verwenden, kennzeichnen Sie die Felder entsprechend. Vor Verwendung eines Objektträgers diesen mit einem sauberen, fusselfreien Tuch gründlich abwischen.

1. Einen Tropfen **Kontrolle +** auf das Feld geben, das Reagenz 1 in der Reihe „+“ entspricht. Einen Tropfen **Kontrolle –** auf das Feld geben, das Reagenz 1 in der Reihe „–“ entspricht.
2. Mit der Mikropipette 50 µL der Probe auf das Feld geben, das Reagenz 1 in der Reihe „S“ und Feld A entspricht.
3. Reagenzfläschchen an der Kappe festhalten und kräftig schütteln (aber nicht auf den Kopf stellen), um das Reagenz gründlich zu mischen. Vor dem Entfernen der Kappe vorsichtig mit dem Boden auf die Tischplatte aufstoßen, damit kein Latex mehr an der Spitze anhaftet.
4. Einen Tropfen **Reagenz A** (Latex-Kontroll suspension) auf Feld A geben.
5. Einen Tropfen **Reagenz 1** auf die Felder in „S“, „+“ und „–“ in der Spalte 1 geben.
6. Proben und Latex-Reagenzien auf allen Testfeldern mit einem Kunststoff-Rührstäbchen verrühren, und zwar immer ein Testfeld mit dem einen Ende und das nächste Testfeld mit dem anderen Ende. Rührstäbchen entsorgen.
7. Testkarte oder Testplatte (Glas) auf einen mechanischen Rotator stellen und 10 min bei einer Geschwindigkeit von  $100 \pm 2$  U/min rotieren lassen. Einen befeuchteten Deckel als Schutz vor Verdunstung auflegen.
8. Nach genau 10 Minuten Testergebnis makroskopisch unter einer leuchtstarken Glühfadenlampe ablesen.

#### INTERPRETATION DER TESTERGEBNISSE

Zuerst das Ergebnis der **Kontrolle +** und **Kontrolle –** ablesen.

**Kontrolle +** sollte innerhalb von 10 Minuten mit **Reagenz 1** zu einer Agglutination führen. **Kontrolle –** darf keine Agglutination aufweisen.

Bei einer Agglutination in der Testzone mit **Reagenz A** kann das Testergebnis nicht interpretiert werden.

Patientenergebnisse ablesen:

**Positives Testergebnis:** Es muß eine Agglutination mit **Reagenz 1** vorliegen. Selbst eine schwache Agglutination mit **Reagenz 1** weist auf das Vorhandensein des entsprechenden Antigens hin. *Bei einer Agglutination mit Reagenz A kann das Testergebnis nicht interpretiert werden.*

**Negatives Testergebnis:** Es darf keine Agglutination mit **Reagenz 1** oder **Reagenz A** vorliegen.

#### VERFAHRENSBESCHRÄNKUNGEN

Latex-Agglutinationstests sind nicht als Ersatz für eine Bakterienkultur gedacht. Eine Bestätigung der Diagnose „bakterielle Meningitis“ ist nur durch entsprechende Kultivierung möglich, die routinemäßig durchgeführt werden sollte.

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 ist bestimmt für den qualitativen Nachweis von Antigenen gegen *H. influenzae* Typ B, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* Gruppe B und *E. coli* K1 in Rückenmarksflüssigkeit, im Serum oder im Urin sowie gegen Streptokokken Gruppe B in Rückenmarksflüssigkeit und im Serum. Au Berdem kann das Testkit für vermutete Kolonien von *H. influenzae* Typ B, Streptokokken der Gruppe B, *S. pneumoniae* und *N. meningitidis* Gruppe B angewendet werden. Das Verhalten bei anderen Probenarten wurde nicht untersucht.

Der **Directigen**-Meningitis-Einzeltest kann nicht in Verbindung mit bluthaltigen Kultivierungsmedien 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 Präsumtvergebnis 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 *H. influenzae*-Stämme Typ B, die kein Kapselantigen besitzen, sind unter Umständen nicht mit immunologischen Testmethoden feststellbar.

Es sind Kreuzreaktionen des *H. influenzae*-Reagenzes in Anwesenheit von *Escherichia coli* K100 bekannt. Weitere Kreuzreaktionen, nicht interpretierbare sowie falsch-positive Ergebnisse können durch eine richtige Probenvorbereitung (siehe die 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 erhitzten im Vergleich zu nicht erhitzten Proben sinkt.

Nicht behandelte Serum- und Urinproben können zusammen mit den Latex-Reagenzien nicht interpretierbare Resultate ergeben. Siehe Abschnitt „Probenvorbereitung“). Proben von Rückenmarksflüssigkeit oder behandeltem Urin, die eine auch noch so schwache Trübung zeigen, zwischen Erhitzen und Testen 10 Minuten lang bei 1400 g zentrifugieren. Getestet wird dann der Flüssigkeitsüberstand.

Laut Abschnitt „Probenvorbereitung“ vorbehandelte Urinproben, die nicht interpretierbar oder vermutlich falsch-positive Ergebnisse aufweisen, können mit einem MILLIPORE-Millex-HA-Filter 0,45 µm (SLHA-0250S) gefiltert und mit den Latex-Reagenzien 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.<sup>22</sup> 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. Häufigkeit und Zeitraum des Auftretens von Antigen im Urin hängen vom einzelnen Patienten, aber auch vom Typ des verabreichten Impfstoffs ab. Die Impfanamnese des Patienten ist wichtig für die korrekte Interpretation von positiven Hib-Antigenresultaten bei geimpften Kleinkindern.<sup>22-24</sup>

Es wurden Kreuzreaktionen einiger *Viridans*-Streptokokkenstämme (*S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)<sup>25</sup> mit dem **Directigen**-*S. pneumoniae*-Latex-Reagenz gefunden. 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 bakterielle Isolate von Blutkulturplatten, die morphologisch der in Verdacht stehenden Kolonie ähnlich sind, sich aber bei der Gramfärbung anders verhalten (d.h. beta-hämolytische, nicht pathogene *Neisseria*-Spezies) können eine nichtspezifische Agglutination oder fälschlicherweise positive Reaktionen mit dem Gruppe-B-Streptokokken-Latex bewirken.

## 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.<sup>3</sup>

## LEISTUNGSMERKMALE

**Empfindlichkeit:** In einer retrospektiven klinischen Studie wurden 177-Rückenmarksflüssigkeits-Proben (erhitzt und nicht erhitzt), 31 Serum- und 40 Urinproben mit den **Directigen**-Meningitis-Reagenzien und per Kontra-Immunelektrophese (CIE) getestet (Tabelle 1, siehe Seite 28). Die 248 getesteten Proben stammten ursprünglich von Patienten mit durch Kultivierung oder CIE bestätigten Infektionen mit *Haemophilus influenzae* Typ B, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* Gruppe B oder Streptokokken Gruppe B.

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. Das **Directigen**-Latex für *Neisseria meningitidis* Gruppe B (**Reagenz 1**) war in der Lage, *E. coli* K1 in Rückenmarksflüssigkeit (4/4), Seren (4/4), Urin (3/4) und konzentriertem Urin (4/4) nachzuweisen. Die Endpunkttempfindlichkeit war mindestens so gut wie die eines anderen handelsüblichen Latex-Agglutinationsreagenz.<sup>15</sup>

Die **Directigen**-Meningitis-Latex-Reagenzien waren beim Nachweis von Antigen in Rückenmarksflüssigkeit, Serum und Urin mindestens so empfindlich wie eine CIE-Methode.

Jedes der **Directigen**-Latex-Reagenzien wurde auch hinsichtlich der Nachweisfähigkeit von teilweise purifiziertem Antigen, das künstlich in Rückenmarksflüssigkeit, Serum und Urin eingebracht worden war, mit einer CIE-Methode 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.<sup>15</sup>

Zusätzlich wurde eine retrospektive Studie an Rückenmarksflüssigkeit (erhitzt und nicht erhitzt) und Urin von Patienten mit einer per Kultivierung bestätigten Infektion mit Streptokokken Gruppe B durchgeführt. Mit **Directigen**

war das Antigen bei 7 von 8 Rückenmarksflüssigkeitsproben, 22 von 25 nicht konzentrierten Urinproben und 10 von 10 25fach konzentrierten Urinproben nachzuweisen.

**Spezifität:** Die Spezifität der **Directigen**-Meningitis-Reagenzien wurde in einer prospektiven klinischen Studie an Rückenmarksflüssigkeits-, Serum- und Urinproben an fünf medizinischen Einrichtungen ermittelt (**Tabelle 2, siehe Seite 29**). 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 30)** aufgeführt.

## LIEFERBARE PRODUKTE

### Best.- Nr. Beschreibung

#### Directigen-Kits:

252260	Test für <i>H. influenzae</i> Typ B (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
251960	Testkit für <i>S. pneumoniae</i> (30 Patienten-, 60-Kontrolltests).
255460	Test für Streptokokken Gruppe B (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
255560	Test für <i>N. meningitidis</i> Gruppe B und <i>E. coli</i> K1 (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
250160	Test für <i>N. meningitidis</i> Gruppe A, C, Y und W135 (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
252360	Menengitis-Combo-Testkit, (30 Patienten-, 60 Kontrolltests).
252480	<b>Directigen</b> Meningitis-Combo-Testkarte (Einmalgebrauch), Packung mit 30 Stück.
256391	<b>Directigen</b> -Probenpuffer, 8 mL.
252350	<b>Directigen</b> -Meningitis-Test, negatives Kontrollreagenz, 9 mL (Packung mit 4 Stück).
278051	<b>Macro-Vue</b> -Kartentest-Rotor mit Verdunstungsschutzdeckel, 100 ± 2 U/min, Zeitautomatik, Friktionsantrieb, Modell 51-1l.

LITERATUR: S. "References" im englischen Text.

## **BD Directigen** **Meningitis Individual Tests**

Per la rilevazione di *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* gruppo B o *Neisseria meningitidis* gruppo B / *Escherichia coli* K1.

Italiano

### USO PREVISTO

Il **Directigen** Meningitis Individual Test sono test presuntivi di agglutinazione al latex su vetrino per la rilevazione qualitativa diretta di antigeni di *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* gruppo B 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* gruppo B. 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%.<sup>1</sup> 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.<sup>2</sup>

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.<sup>3</sup>

Lo streptococco di gruppo B ed *Escherichia coli* K1 sono i principali patogeni batterici nei neonati.<sup>4-7</sup> Ceppi di streptococchi di gruppo B e di *Escherichia coli* K1 colonizzano spesso nella vagina e/o nel retto e possono essere associati a sepsi periperale nonch  a sepsi, polmonite e meningite neonatale.<sup>8</sup> L'antigene polisaccaridico di *E. coli* K1 si è dimostrato strutturalmente e immunologicamente simile all'antigene di *Neisseria meningitidis* di gruppo B.<sup>9,10</sup> 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 alla luce delle elevate morbilit  e mortalit  associate a streptococchi di gruppo B e ad *E. coli* K1 nei neonati.<sup>4</sup>

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

### PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Anticorpi specifici si legano 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 a seguito di infezioni da *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* gruppi A,B,C,Y o W135 ed *Escherichia coli* K1 e nel liquido cerebrospinale o nel siero a seguito di infezione da streptococco di gruppo b.

Questi antigeni possono essere rilevati con il kit **Directigen Meningitis Combo Test** o con i kit di test individuali per meningite Directigen (vedere "Disponibilità").

## REAGENTI

Test individuali per meningite **Directigen**

### *Haemophilus influenzae* tipo b

<b>Reagente 1</b>	(1,0 mL),	Anti- <i>H. influenzae</i> tipo b, sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
<b>Reagente A</b>	(0,5 mL),	Latex di controllo, sospensione di latex rivestito di immunoglobuline di coniglio. Ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante).
<b>Controllo +</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene positivo polivalente, antigeni di streptococco di gruppo B, <i>N. meningitidis</i> gruppi A, C, Y e W135, <i>H. influenzae</i> tipo b ed <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Controllo -</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene negativo, soluzione fisiologica tamponata con glicina; ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante).

### *Streptococcus pneumoniae*:

<b>Reagente 1</b>	(1,0 mL),	Anti- <i>S. pneumoniae</i> , sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
<b>Reagente A</b>	(0,5 mL),	Latex di controllo, sospensione di latex rivestito di immunoglobuline di coniglio. Ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante).
<b>Controllo +</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene positivo polivalente, antigeni di Streptococcus di gruppo B, <i>N. meningitidis</i> gruppi A, C, Y e W135, <i>H. influenzae</i> tipo b ed <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Controllo -</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene negativo, soluzione fisiologica tamponata con glicina; ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante).

### Streptococco di gruppo B

<b>Reagente 1</b>	(1,0 mL),	Anti- <i>Streptococcus</i> gruppo B, sospensione di latex rivestito di anticorpi policlonali di coniglio,
<b>Reagente A</b>	(0,5 mL),	Latex di controllo, sospensione di latex rivestito di immunoglobuline di coniglio. Ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante).
<b>Controllo +</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene positivo polivalente, antigeni di streptococco di gruppo B, <i>N. meningitidis</i> gruppi A, C, Y e W135, <i>H. influenzae</i> tipo b ed <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Controllo -</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene negativo, soluzione fisiologica tamponata con glicina; ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante).

### *Neisseria meningitidis* gruppo B / *E. coli* K1:

<b>Reagente 1</b>	(1,0 mL),	Anti- <i>N. meningitidis</i> gruppo B / <i>E. coli</i> K1, sospensione di latex rivestito di anticorpi monoclonali di topo,
<b>Reagente A</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).
<b>Controllo +</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene positivo polivalente, antigeni di <i>N. meningitidis</i> gruppi A, C, Y e W135, <i>H. influenzae</i> tipo b, streptococco di gruppo B ed <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Controllo -</b>	(1,5 mL),	Controllo antigene negativo, soluzione fisiologica tamponata con glicina; ognuno di questi flaconi contiene sodio azide allo 0,2% (conservante).

### Precauzioni - Per uso diagnostico *in vitro*.

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 guida dell'istituto e alle "Precauzioni standard".<sup>18-21</sup> 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** - Se si usa il vetrino, disinfettarlo dopo ogni utilizzo e lavarlo prima di usarlo nuovamente. Si consiglia un disinfettante fenolico. Prima di riutilizzare il vetrino, sciacquarlo accuratamente per eliminare completamente tutti i detersivi 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 ore), 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 pretrattamento 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 e accessori.

**Materiali necessari ma non forniti** - Cartoncini per il test **Directigen Meningitis Combo**, soluzione tampone **Directigen**, rotatore (100 ± 2 giri/min), coperchio umidificatore, } (vedere "Disponibilità")  
micropipetta da 50 µL, puntali per pipette

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. In caso di test di liquido cerebrospinale per la rilevazione di *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae* e streptococco di gruppo b, 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 x g dopo il riscaldamento e prima del test. Usare il sovrantante come campione da testare.

3. Testare il campione (riscaldato o non riscaldato, a seconda del caso) come descritto in "Procedura del test".

#### Preparazione dei campioni (siero)

1. Diluire 1:1 i campioni di siero 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. Con un bastoncino di legno, frammentare il coagulo di proteine formatosi e vortexare energicamente (per circa 5 sec).

4. Centrifugare ad almeno 1400 x 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 x 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 x g.

2. I campioni di urina possono essere concentrati 25 volte usando un concentratore Minicon B-15 (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts, USA).

3. Diluire 1:1 almeno 200 µL di urina concentrata con tampone **Directigen** e mescolare.

4. Riscaldare i campioni per 5 min a 100 °C (in bagnomaria o termoblocco) e lasciarli raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.

5. Centrifugare ad almeno 1400 x g per 10 min.

6. Testare il sovrantante come descritto in "Procedura del test".

#### Preparazione per la conferma di colonie da coltura

1. Sulla superficie dell'agar contenente colture di 18 – 24 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**.

2. In una provetta di vetro piccola (10 x 75 mm o equivalente), pipettare 0,5 mL (circa 10 gocce) di reagente di controllo negativo.

3. 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.
4. Riscaldare la sospensione per 3 min a 100 °C (in bagnomaria o termoblocco) e lasciarla raffreddare a temperatura ambiente prima del test.
5. Centrifugare ad almeno 1400 x g per 10 min.
6. Testare il sovrantante 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 il **Controllo +** e il **Controllo –** 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 inserire il vassoio dei reagenti nell'apposita sede nella workstation.

**Verdere le illustrazioni contenute nello Schema di procedura a pagina 31.**

Usare il cartoncino o il vetrino del test Meningitis Combo per l'analisi dei campioni. Se il cartoncino Meningitis Combo è usato per l'analisi di più di un campione, contrassegnare i cerchi in modo appropriato. Prima di usare il vetrino, pulirlo accuratamente con un panno che non lasci residui.

1. Dispensare una goccia di **Controllo +** sul cerchio corrispondente al Reagente 1 della fila "+". Dispensare una goccia di **Controllo –** sul cerchio corrispondente al Reagente 1 della fila "-".
2. Con una micropipetta, dispensare 50 µL di campione da testare sul cerchio corrispondente al Reagente 1 della fila "S" e del cerchio A.
3. Tenendo il flacone dispensatore per il tappo, agitare energicamente (senza capovolgere) per mescolare accuratamente ogni reagente. Prima di togliere il tappo al flacone, picchiettare delicatamente la base su un ripiano per garantire che nella punta non rimanga alcuna goccia di latex.
4. Dispensare una goccia di **Reagente A** (Sospensione Latex di Controllo) nel cerchio A.
5. Dispensare una goccia di **Reagente 1** sui cerchi "+", "-" e "S" nella colonna corrispondente al Reagente 1.
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.
7. Porre il cartoncino o vetrino su un rotatore meccanico e farlo ruotare a 100 ± 2 giri/min per 10 min. Usare un coprchio umidificatore per impedire l'evaporazione.
8. Al termine dei 10 minuti, eseguire immediatamente una lettura macroscopica dei risultati sotto una lampada a incandescenza ad alta intensità.

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Registrare innanzi tutto i risultati del **Controllo +** e **Controllo –**.

Il **Controllo +** deve evidenziare agglutinazione con il **Reagente 1** entro 10 min, mentre il **Controllo –** non deve mostrare alcuna agglutinazione.

Un'eventuale agglutinazione nel cerchio contenente il **Reagente A**, non consente l'interpretazione della reazione. Registrare i risultati del test.

**Test positivo** – Deve evidenziare agglutinazione con il **Reagente 1**. La formazione di qualsiasi grado di agglutinazione con il **Reagente 1** indica la presenza dell'antigene corrispondente. *Un'eventuale agglutinazione del Reagente A non consente l'interpretazione della reazione.*

**Test negativo** – Non deve evidenziare alcuna agglutinazione con il **Reagente 1** o il **Reagente A**.

#### 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 colturali appropriate e deve essere condotta di routine.

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* gruppo B 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, streptococco di gruppo B, *S. pneumoniae* e *N. meningitidis* gruppo B. Non sono state accertate le performance con altre tipologie di campione.

I test individuali **Directigen** Meningitis non possono essere usati 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 sepsi 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 *H. influenzae* tipo b non provvisti di antigene capsulare, non possono essere rilevati con tecniche immunologiche.

È noto che il reagente *H. influenzae* cross-reacts in presenza di *Escherichia coli* K100. *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.

I campioni di siero e urina non trattati possono dare risultati non interpretabili con i reagenti al latex. Vedere "PROCEDURE - Preparazione dei campioni". I campioni di LCS o di urina trattati che evidenziano una certa torbidità devono essere centrifugati per 10 minuti 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-0250S) 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.<sup>22</sup> 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.<sup>22-24</sup>

Alcuni ceppi del gruppo degli streptococchi viridans (es. *S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)<sup>25</sup> 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 patogene 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 etiologici responsabili di circa l'84% dei casi di meningite batterica.<sup>3</sup>

## PRESTAZIONI METODOLOGICHE

**Sensibilità** - Nel corso di una valutazione clinica retrospettiva, 177 campioni di liquido cerebrospinale (riscaldati e non riscaldati), 31 di siero e 40 di urina sono stati testati con i reagenti al latex **Directigen Meningitis** e mediante controimmuno-elettroforesi (CIE) (vedi **Tabella 1, pagina 28**). I 248 campioni testati erano stati originariamente prelevati da pazienti con casi confermati positivi - mediante coltura o controimmuno-elettroforesi - di infezione da *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* gruppo B o da streptococco di gruppo B.

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 Neisseria meningitidis** gruppo B (**Reagente 1**) ha rilevato *E. coli* K1 nel LCS (4/4), nel siero (4/4), nell'urina (4/4) e nell'urina concentrata (4/4). La sensibilità di endpoint sono risultate identiche o migliori di quelle osservate con il reagente di agglutinazione al latex in commercio.<sup>15</sup>

I reagenti al latex **Directigen Meningitis** hanno evidenziato una sensibilità uguale o superiore a quella della controimmuno-elettroforesi nella rilevazione di antigene in campioni di liquido cerebrospinale, siero e urina.

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

È stato inoltre eseguito uno studio retrospettivo su campioni di liquido cerebrospinale (riscaldato e non riscaldato) e di urina prelevati da pazienti con infezione da streptococco di gruppo B confermata mediante metodiche culturali. **Directigen** ha rilevato l'antigene in sette campioni di LCS su otto, 22 campioni di urina non concentrata su 25 e 10 campioni di urina (concentrata 25 volte) su 10.

**Specificità** - La specificità dei reagenti **Directigen Meningitis** è stata determinata testando campioni prospettici di LCS, siero e urina nel corso di studi clinici condotti in cinque istituti (vedi **Tabella 2, pagina 29**). 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 dei microrganismi. Le performance sono riportate nella **Tabella 3 (vedi pagina 30)**.

## DISPONIBILITÀ

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

**BIBLIOGRAFIA:** Vedere "References" nel testo inglese.

# **Directigen** **Meningitis Individual Tests**

Para la detección de *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* grupo B o *Neisseria meningitidis* grupo B/*Escherichia coli* K1.

Español

## USO PREVISTO

Las pruebas individuales **Directigen** Meningitis son análisis de presunción de aglutinación del látex en portaobjetos para la detección cualitativa directa de antígenos frente a *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupo B y *Escherichia coli* K1 en el líquido cefalorraquídeo (LCR), el suero o la 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, este equipo de prueba proporciona confirmación y permite identificar el serogrupo de presuntas colonias de *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* grupo B y *N. meningitidis* grupo B. Se produce una aglutinación visible cuando una muestra que contiene cualquiera de estos antígenos bacterianos reacciona con microesferas de látex revestidas con sus respectivos anticuerpos.

## 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 meningitis<sup>1</sup>. 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 antimicrobiano<sup>2</sup>.

*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 bacteriana<sup>3</sup>. *Streptococcus* grupo B y *Escherichia coli* K1 son importantes patógenos bacterianos en el recién nacido<sup>4-7</sup>. 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 nacido<sup>8</sup>. 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* grupo B<sup>9,10</sup>. El reactivo de látex **Directigen** para *Neisseria meningitidis* 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 microorganismos<sup>4</sup>.

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 contraelectroforesis (CIE) y la aglutinación del látex<sup>11-14</sup>. El procedimiento de aglutinación del látex ha demostrado ser más rápido y sensible que la CIE en la detección de antígeno purificado<sup>15-17</sup>.

## 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. Estos antígenos polisacáridos solubles específicos se acumulan en el LCR, el suero o la orina como consecuencia de la infección por *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupos A, B, C, Y o W135 y *Escherichia coli* K1, así como en el LCR o el suero como consecuencia de la infección por *Streptococcus* grupo B. Estos antígenos pueden detectarse con el equipo para pruebas **Directigen** Meningitis Combo o con los equipos para pruebas individuales **Directigen** Meningitis (véase "Presentación").

## REACTIVOS

Pruebas individuales **Directigen Meningitis:**

### **Haemophilus influenzae tipo b:**

<b>Reactivo 1</b>	(1,0 mL),	Suspensión de látex revestido de anticuerpos policlonales de conejo anti- <i>H. influenzae</i> tipo b,
<b>Reactivo A</b>	(0,5 mL),	Látex de control, suspensión de látex revestido de inmunoglobulina de conejo, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).
<b>Control +</b>	(1,5 mL),	Control positivo de antígeno polivalente, antígenos de <i>Streptococcus</i> grupo B y <i>N. meningitidis</i> grupos A, C, Y y W135, <i>H. influenzae</i> tipo b y <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Control -</b>	(1,5 mL),	Control negativo de antígeno, solución salina tamponada con glicina, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).

### **Streptococcus pneumoniae:**

<b>Reactivo 1</b>	(1,0 mL),	Suspensión de látex revestido de anticuerpos policlonales de conejo anti- <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Reactivo A</b>	(0,5 mL),	Látex de control, suspensión de látex revestido de inmunoglobulina de conejo, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).
<b>Control +</b>	(1,5 mL),	Control positivo de antígeno polivalente, antígenos de <i>Streptococcus</i> grupo B y <i>N. meningitidis</i> grupos A, C, Y y W135, <i>H. influenzae</i> tipo b y <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Control -</b>	(1,5 mL),	Control negativo de antígeno, solución salina tamponada con glicina, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).

### **Streptococcus grupo B:**

<b>Reactivo 1</b>	(1,0 mL),	Suspensión de látex revestido de anticuerpos policlonales de conejo anti- <i>Streptococcus</i> grupo B,
<b>Reactivo A</b>	(0,5 mL),	Látex de control, suspensión de látex revestido de inmunoglobulina de conejo, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).
<b>Control +</b>	(1,5 mL),	Control positivo de antígeno polivalente, antígenos de <i>Streptococcus</i> grupo B, <i>N. meningitidis</i> grupos A, C, Y y W135, <i>H. influenzae</i> tipo b y <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Control -</b>	(1,5 mL),	Control negativo de antígeno, solución salina tamponada con glicina, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).

### **Neisseria meningitidis grupo B / E. coli K1:**

<b>Reactivo 1</b>	(1,0 mL),	Suspensión de látex revestido de anticuerpos monoclonales de ratón anti- <i>N. meningitidis</i> grupo B / <i>E. coli</i> K1,
<b>Reactivo A</b>	(0,5 mL),	Látex de control, suspensión de látex revestido de inmunoglobulina de ratón, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).
<b>Control +</b>	(1,5 mL),	Control positivo de antígeno polivalente, antígenos de <i>N. meningitidis</i> grupos A, B, C, Y y W135, <i>H. influenzae</i> tipo b, <i>Streptococcus</i> grupo B y <i>S. pneumoniae</i> ,
<b>Control -</b>	(1,5 mL),	Control negativo de antígeno, solución salina tamponada con glicina, cada una con azida sódica al 0,2% (conservante).

### **Precauciones:** Para diagnóstico *in vitro*.

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"<sup>18-21</sup> y las directrices del centro. Antes de desecharlos, esterilice en autoclave los recipientes para muestras y cualquier otro material contaminado.

**Reactivos:** No utilizar pasada la fecha de caducidad. Una vez retirados del frigorífico, permita que los reactivos se calienten hasta la temperatura ambiente (15 – 30 °C) antes de usarlos.

Con el fin de garantizar un suministro de gotas adecuado, el frasco dispensador debe sujetarse en posición vertical mientras se dispensa una gota de caída libre cada vez.

**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, lávela 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 el **Control +** y el **Control -** no producen los resultados adecuados.

**Tarjetas de análisis:** 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. Deben tomarse precauciones para no dejar huellas de dedos en las áreas de prueba, puesto que esto puede provocar un depósito de grasa con el consiguiente resultado incorrecto de la prueba. Utilice cada tarjeta una sola vez y deséchela. Conserve las tarjetas en su envase original en un área seca a temperatura ambiente. Cuando extienda la muestra dentro de los límites de las áreas de prueba, evite arañar la superficie de la tarjeta con los agitadores de plástico. Si la muestra no se extiende hasta el perímetro externo del área de prueba, utilice otra área de prueba de la 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. Cértese de que todo el detergente y todo el desinfectante hayan sido eliminados por completo del portaobjetos antes de volver a utilizarlo.

**Rotación:** La velocidad recomendada para la rotación mecánica es de 100 ± 2 rpm, pero una rotación de 95 – 110 rpm no altera de forma significativa los resultados obtenidos. El agitador rotativo debe circunscribirse 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 recibirlos, retire el envase de cartón que contiene los reactivos y refrigérelas a una temperatura de 2 – 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

El uso de tubos de ensayo de vidrio cubiertos (borosilicato) en un baño María a 100 °C (ebullición) es el medio más eficaz para el pretratamiento de las muestras. 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:

El área de prueba, todos los reactivos, las muestras para prueba y los componentes de la prueba deben encontrarse a temperatura ambiente (15 – 30 °C) cuando se utilicen.

**Materiales suministrados:** Todos los materiales indicados bajo el epígrafe “Reactivos”, la estación de trabajo y los accesorios.

**Materiales necesarios pero no suministrados:** Tarjetas de análisis **Directigen Meningitis** Combo, solución tampón para muestras **Directigen**, agitador rotativo, 100 ± 2 rpm, tapa } (véase “Disponibilidad”) humidificadora, micropipeta de 50 µL, puntas de pipeta

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. Cuando se analizan muestras de LCR para *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae* y *Streptococcus* grupo B, deben calentarse las muestras durante 3 minutos a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permitir que se enfríen hasta temperatura ambiente antes de usarlas.

Para una sensibilidad óptima, las pruebas para *N. meningitidis* grupo B / *E. coli* K1 deben realizarse en muestras no calentadas (véase “Limitaciones del procedimiento”).

2. Las muestras de LCR que presenten turbidez deben centrifugarse tras el calentamiento durante 10 minutos a 1400 x g antes de la prueba. Debe utilizarse como muestra para el análisis el líquido sobrenadante.

3. Analice la muestra (calentada o no calentada, según proceda) tal y como se describe en “Procedimiento de análisis”.

### Preparación de las muestras (suero):

1. Diluya las muestras de suero de al menos 0,4 mL 1:1 con el tampón para muestras **Directigen** y mézclelo.

2. Caliente las muestras durante 5 minutos a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríen hasta la temperatura ambiente antes de su uso.

3. Utilizando un aplicador de madera, rompa el “coágulo” de proteína formado, y agite vigorosamente (aproximadamente 5 segundos).

4. Centrifugue a un mínimo de 1400 x g durante 15 minutos.

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 minutos 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 minutos.

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 minutos antes de su concentración.

2. Las muestras de orina pueden concentrarse por un factor de 25 con un concentrador Minicon B-15 (Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts, EE.UU.).

3. Diluya al menos 200 µL de orina concentrada 1:1 con el tampón para muestras **Directigen** y mézclelo.

4. Caliente las muestras durante 5 minutos a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríen hasta la temperatura ambiente antes de su uso.

5. Centrifugue a un mínimo de 1400 x g durante 10 minutos.

6. Analice el líquido sobrenadante tal como se describe en la sección “Procedimiento de análisis”.

### Procedimiento para la confirmación de colonias del cultivo:

1. 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**.

2. Pipetee 0,5 mL (aproximadamente 10 gotas) de reactivo de control - en un tubo de ensayo de vidrio pequeño (10 x 75 mm o equivalente).

3. 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.
4. Caliente la suspensión durante 3 minutos a 100 °C (p. ej., baño María o bloque térmico) y permita que se enfríe hasta la temperatura ambiente antes de la prueba.
5. Centrifugue a un mínimo de 1400 x g durante 10 minutos.
6. 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 **Control +** y **Control –** 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 las instrucciones de 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):

Retire los reactivos de su lugar de refrigeración e introduzca la bandeja de reactivos en la ranura ubicada en la unidad de trabajo del equipo.

#### Consulte las ilustraciones incluidas en el esquema del procedimiento de la página 31.

Utilizar la tarjeta de análisis combinado para la meningitis o el portaobjetos de vidrio para analizar las muestras. Si utiliza la tarjeta de análisis combinado para más de una muestra, marque los círculos correctamente. Antes de utilizar el portaobjetos de vidrio, límpielo a conciencia con papel tisú sin pelusa.

1. Deje caer una gota de **Control +** en el círculo correspondiente al reactivo 1 de la fila "+". Deje caer una gota de **Control –** en el círculo correspondiente al reactivo 1 de la fila "-".
2. Micropipetee 50 µL de muestra para análisis en el círculo correspondiente al reactivo 1 de la fila "S" y rodee A con un círculo.
3. Sujetando el frasco dispensador por el tapón, balancéelo vigorosamente (sin invertirlo) para mezclar a conciencia cada reactivo. Antes de quitar el tapón del frasco, golpee suavemente la base sobre la cimera para verificar que no queda látex en la punta.
4. Deje caer una gota de **Reactivo A** (suspensión de látex de control) en el círculo A.
5. Deje caer una gota de **Reactivo 1** en los círculos "+", "- y "S" en la columna correspondiente al reactivo 1.
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.
7. Coloque la tarjeta de análisis o el portaobjetos de vidrio en un agitador rotativo mecánico y hágalo girar a 100 ± 2 rpm durante 10 min. Use una tapa humidificadora para prevenir la evaporación.
8. Inmediatamente después de concluir los 10 minutos, lea los resultados de la prueba macroscópicamente bajo una luz incandescente de alta intensidad.

#### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Registre primero los resultados de los análisis del **Control +** y del **Control –**.

El **Control +** debe presentar aglutinación con el **Reactivo 1** a los 10 minutos. El **Control –** no debe mostrar aglutinación.

La aglutinación en el círculo que contiene el **Reactivo A** hace imposible la interpretación del análisis.

Registre los resultados de la prueba del paciente:

**Prueba positiva:** Debe mostrar aglutinación con el **Reactivo 1**. Cualquier grado de aglutinación con el **Reactivo 1** indica la presencia del antígeno correspondiente. *La aglutinación del Reactivo A hace imposible la interpretación del análisis.*

**Prueba negativa:** No debe mostrar aglutinación con el **Reactivo 1** ni con el **Reactivo A**.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Estas pruebas de aglutinación del látex no están destinadas a sustituir al cultivo bacteriano. El diagnóstico de confirmación de meningitis bacteriana sólo es posible mediante los procedimientos de cultivo adecuados, y debe llevarse a cabo sistemáticamente.

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 está destinado a la detección cualitativa de antígenos frente a *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* grupo B y *E. coli* K1 en el LCR, el suero o la orina, así como frente a *Streptococcus* grupo B en el LCR y el suero. Además, este equipo de prueba también puede utilizarse con presuntas colonias de *H. influenzae* tipo b, de *Streptococcus* grupo B, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* grupo B. No se ha evaluado el rendimiento de este análisis con otros tipos de muestras.

Las pruebas individuales **Directigen** Meningitis no pueden utilizarse 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 *H. 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. 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 (véanse las secciones "Tratamiento preliminar de las muestras" y "Preparación de las muestras").

Los estudios con muestras de LCR sembradas con antígenos de *N. meningitidis* 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.

Las muestras de suero y orina no tratadas pueden generar resultados no interpretables con los reactivos de látex. Véase "Preparación de las muestras". Las muestras de LCR o las muestras de orina tratadas que presenten cualquier grado de turbidez deben centrifugarse durante 10 minutos a 1400 x g tras el calentamiento, y antes de la prueba. Debe utilizarse como muestra para el análisis el líquido sobrenadante.

Las muestras de orina tratadas (véase "Preparación de las muestras") que arrojen resultados no interpretables o positivos que se sospeche son falsos podrán ser filtradas usando el filtro MILLIPORE MillexHA 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 -. 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 localizantes<sup>22</sup>. 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 la duración del antígeno dependen del paciente y del tipo de vacunas suministradas. Es importante disponer del historial de vacunación del paciente para poder interpretar correctamente los resultados positivos para el antígeno de Hib en orina en los lactantes vacunados<sup>22-24</sup>.

Ciertas cepas de estreptococos viridans (*S. mitis*, *S. sanguis* II, *S. salivarius*)<sup>25</sup> 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. Ciertas cepas bacterianas aisladas a partir de placas de hemocultivos que son morfológicamente similares a la colonia sospechosa, pero cuya tinción de Gram no concuerda con ella, pueden presentar una aglutinación inespecífica, reacciones falsas positivas o ambas cosas (p. ej., especies de *Neisseria* beta-hemolíticas no patógenas) con el látex para grupo B Strep.

## VALORES ESPERADOS

*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 bacteriana<sup>3</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

**Sensibilidad:** En una evaluación clínica retrospectiva, 177 muestras de líquido cefalorraquídeo (calentado y no calentado), 31 muestras de suero y 40 muestras de orina se analizaron mediante los reactivos **Directigen** Meningitis y mediante contraímmunoelectroforesis (CIE) (Tabla 1, véase pág. 28). Las 248 muestras analizadas se obtuvieron originalmente de pacientes con casos confirmados mediante cultivo o CIE de infección por *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* grupo B o estreptococos del grupo B.

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 *Neisseria meningitidis* grupo B (Reactivo 1) fue capaz de detectar *E. coli* K1 en el LCR (4/4), el suero (4/4), la orina (3/4) y la orina concentrada (4/4). Los criterios de valoración para la sensibilidad fueron iguales o mejores que las observadas con otro reactivo de látex comercialmente disponible<sup>15</sup>.

Los reactivos de látex **Directigen** Meningitis han demostrado ser iguales o más sensibles que la CIE en la detección del antígeno en muestras de LCR, suero y orina.

Cada reactivo **Directigen** de látex se comparó además con la contraímmunoelectroforesis respecto de su capacidad para detectar antígeno parcialmente purificado sembrado en LCR, suero y orina. En la prueba de CIE se utilizó un antisuero para cada antígeno disponible comercialmente. Los reactivos de látex **Directigen** fueron más sensibles que la CIE<sup>15</sup>.

Además, se llevó a cabo un estudio retrospectivo con muestras de LCR (calentado o no calentado) y de orina obtenidas de pacientes con infección por estreptococos del grupo B confirmada mediante cultivo. **Directigen** detectó el antígeno en 7 de 8 muestras de LCR, 22 de 25 muestras de orina no concentrada y 10 de 10 muestras de orina concentradas por un factor de 25.

**Especificidad:** La especificidad de los reactivos **Directigen** Meningitis se determinó analizando muestras prospectivas de LCR, suero y orina en estudios clínicos realizados en cinco centros (Tabla 2, véase pág. 29). 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 de rendimiento se relacionan en la **Tabla 3 (véase pág. 30)**.

#### DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
	Equipos <b>Directigen</b> :
252260	Equipo de pruebas para <i>H. influenzae</i> tipo b (30 pruebas para paciente, 60 controles).
251960	Equipo de pruebas para <i>S. pneumoniae</i> (30 pruebas para paciente, 60 controles).
255460	Equipo de pruebas para grupo B Strep (30 pruebas para paciente, 60 controles).
255560	Equipo de pruebas <i>N. meningitidis</i> grupo B / <i>E. coli</i> K1 (30 prueba para paciente, 60 controles).
250160	Equipo de pruebas <i>N. meningitidis</i> grupos A, C, Y y W135 (30 pruebas para paciente, 60 controles).
252360	Equipo de pruebas Meningitis Combo (30 pruebas para paciente, 60 controles).
252480	Tarjeta para <b>Directigen</b> Meningitis Combo Test (para un solo uso), caja de 30.
256391	Tampón para muestras <b>Directigen</b> , 8 mL.
252350	Reactivo de control negativo <b>Directigen</b> Meningitis, 9 mL, caja de 4.
278051	Agitador rotativo <b>Macro-Vue</b> para tarjetas para prueba con tapa humidificadora, 100 ± 2 rpm, temporizador automático, transmisión por fricción, modelo 51-II.

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

Table 1 / Tableau 1 / Tabelle 1 / Tabella 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 / Comparación de Directigen y CIE en muestras conservadas

Specimen / Echantillon / Probe / Campione / Muestra	Antigen Present / Antigène présent / Antigen vorhanden / Antigene presente / Antigeno presente	Methods / Méthodes / Methoden / Metodi / Métodos	No. Positive / N° de positifs / Anzahl der positiven / Risultati positivi / N° de resultados positivos	No. Negative / N° de négatifs / Anzahl der negativen / Risultati negativi / N° de resultados negativos
CSF / LCR / Liquor / LCS	<i>H. influenzae</i> type b	Directigen CIE	83 66	14 31
	<i>S. pneumoniae</i>	Directigen CIE	36 33	9 12
	Group B <i>Streptococcus</i>	Directigen CIE	4 2	4 6
	<i>N. meningitidis</i> Group B	Directigen CIE	11 7	16 20
Serum / Siero / Suero	<i>H. influenzae</i> type b	Directigen CIE	7 5	2 4
	<i>S. pneumoniae</i>	Directigen CIE	17 17	5 5
Urine / Urin / Urina / Orina	<i>H. influenzae</i> type b	Directigen CIE	12 2	4 14
	<i>S. pneumoniae</i>	Directigen CIE	7 1	12 18
	Group B <i>Streptococcus</i>	Directigen CIE	3 2	2 3

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

Testing of Specimens from Patients without *H. influenzae* type b, *S. pneumoniae*, Group B *Streptococcus* or *N. meningitidis* Group B Infection

Analyse d'échantillons provenant de patients non infectés par *H. influenzae* de type b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* du groupe B ou *N. meningitidis* du groupe B / Testen von Proben aus Patienten, die mit *H. influenzae* Typ b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* Gruppe B oder *N. meningitidis* der Gruppe B nicht infiziert waren / Analisi di campioni prelevati da pazienti privi di infezione da *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* gruppo B o *N. meningitidis* gruppo B / Análisis de muestras de pacientes sin infección por *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae*, *Streptococcus* grupo B o *N. meningitidis* grupo B

Specimen / Echantillon / Probe / Campione / Muestra	Latex Reagent / Réactif au latex / Latex-Reagenz / Reagente al latex / Reactivo de Látex	No. Tested / N° de testé / Anzahl der Testproben / N° di analisi / N° de muestras analizadas	No. Negative / N° de négatifs / Anzahl der negativen Proben / N° dei risultati negativi / N° de muestras negativas	Specificity % / Spécificité % / Spezifität in % / Specificità (%) / Especificidad %
CSF / LCR / Liquor / LCS	<i>H. influenzae</i> type b	146	146	100
	<i>S. pneumoniae</i>	146	146	100
	Group B <i>Streptococcus</i>	37	37	100
	<i>N. meningitidis</i> Group B / <i>E. coli</i> K1	148	148	100
Serum / Siero / Suero	<i>H. influenzae</i> type b	124	124	100
	<i>S. pneumoniae</i>	125	125	100
	Group B <i>Streptococcus</i>	30	30	100
	<i>N. meningitidis</i> Group B / <i>E. coli</i> K1	126	126	100
Urine / Urin / Urina / Orina	<i>H. influenzae</i> type b	120	119	99
	<i>S. pneumoniae</i>	120	119	99
	Group B <i>Streptococcus</i>	40	40	100
	<i>N. meningitidis</i> Group B / <i>E. coli</i> K1	120	120	100
Urine conc. 25 x	<i>H. influenzae</i> type b	30	30	100
	<i>S. pneumoniae</i>	30	29	97
	Group B <i>Streptococcus</i>	11	11	100
	<i>N. meningitidis</i> Group B / <i>E. coli</i> K1	30	30	100

Table 3 / Tableau 3 / Tabelle 3 / Tabella 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 colonia / 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. identificación bioquímica**

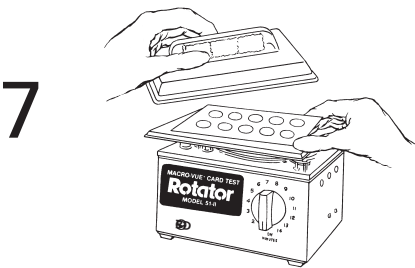
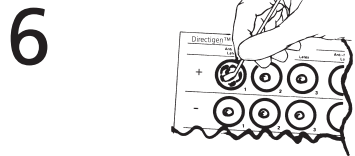
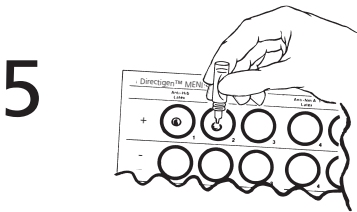
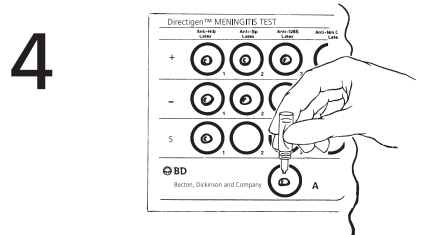
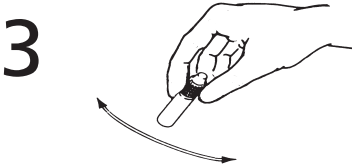
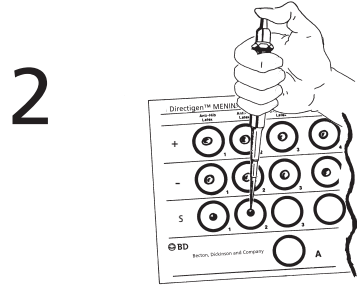
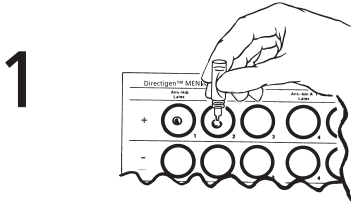
Suspected Organism / Organisme suspecté / Vermuteter Organismus / Organismo sospetto / Organismo presunto	No. Tested / N° de testé / Anzahl der Testproben / N° di analisi / N° de muestras analizadas	Relative Sensitivity (95% Confidence Interval) / Sensibilité relative (Intervalle de confiance 95 %) / Relative Empfindlichkeit (Vertrauensintervall ist 95 %) / Sensibilità relativa (Intervallo di confidenza del 95%) / Sensibilidad relativa (intervalo de confianza del 95%)	Relative Specificity (95% Confidence Interval) / Spécificité relative (Intervalle de confiance 95 %) / Relative Spezifität (Vertrauensintervall ist 95 %) / Specificità relativa (Intervallo di confidenza del 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 / % de inicial no interpretable
<i>H. influenzae</i> type b	112	100% (92 – 100)	98.5% (92 – 100) <sup>2</sup>	3.6%
<i>S. pneumoniae</i>	124	93% (84 – 98)	79.0% (66 – 88) <sup>1</sup>	0%
Group B <i>Streptococcus</i>	129	100% (95 – 100)	90.5% (80 – 96) <sup>1</sup>	0%
<i>N. meningitidis</i> Group B	106	85% (55 – 98)	100% (96 – 100) <sup>2</sup>	4.7%










<sup>1</sup> Refer to the "Limitations of The Procedure." / Se référer à "Limites de la méthode". / Siehe: "Verfahrensbeschränkungen". / Vedere "Limitazioni della procedura". / Refiérase a "Limitaciones del procedimiento".

<sup>2</sup> Results after repeat testing with 1:10 dilution. / Résultats après une réplique 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 obtenidos después de pruebas repetidas con dilución 1:10.

Procedural Chart / Tableau de procédure / Darstellung des Verfahrens /  
 Schema di procedura / Esquemas de procedimiento

Performance of Test / Exécution du test / Durchführung des Tests /  
 Esecuzione del Test / 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 / Tilverkare / Производители / Producător / Üretici / Proizvođač / Производител / Аткарушы



Use by / Spotřebuje 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 / Použítte do / Usar antes de / Använd före / Исползуйте до / A se utiliza până la / Son kullanna tarihi / Upotrebiti do / Исползовать до / дейин пайдаланура / Uprorijebiti 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 = mėnesio 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 mesiaca) / aaaa-mm-dd / aaaa-mm (mm = fin del mes) / ÁÁÁÁ-MM-DD / ÁÁÁÁ-MM (MM = slutet på månaden) / ГГГГ-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = 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-MM-ДД / ГГГГ-MM (MM = конец месяца) / ЖӨЖӨК-АА-КК / ЖӨЖӨК-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 / Katalogo numeris / Numer katalogowy / Número do catálogo / Katalogové číslo / Número de catálogo / Katalogen номер / Număr de catalog / Katalog numarası / Kataloski broj / Каталог номер / Каталог нөмірі



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



In Vitro Diagnostic Medical Device / Lékařské zařízení určené pro diagnostiku in vitro / In vitro diagnostisk medicinsk anordning / Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnose / In vitro diagnostiska meditsiniaparatuur / Lääkinnällinen in vitro -diagnostiikkalaitte / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Medizinisches In-vitro-Diagnostikum / In vitro διαγνωστική ιατρική συσκευή / In vitro diagnosztikai orvosi eszköz / Dispositivo medico diagnostico in vitro. / In vitro diagnostikos prietaisais / In vitro diagnostisk medisinsk utstyr / Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro / Dispositivo médico para diagnóstico in vitro / Medicínska pomôcka 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 Diagnostic Tibbi Cihaz / Medicinski uređaj za in vitro dijagnostiku / Медицинский прибор для диагностики ин витро / Жасанды жағдайда жүргізетін медициналық диагностика аспабы / Medicínska pomagala za In Vitro Dijagnostiku



Temperature limitation / Teplotní omezení / Temperaturbegrænsning / Temperaturlimit / Temperaturi piirang / Lämpötilarajoitus / Température limite / Zulässiger Temperaturbereich / Οριο θερμοκρασίας / Hömerséklet határ / Temperatura limite / Laikymo temperatūra / Temperaturbegrænsning / Ograniczenie temperatury / Limitação da temperatura / Ohraničenje teploty / Limitación de temperatura / Temperaturbegrænsning / Температурни ограничения / Limitare de temperatură / Sıcaklık sınırlaması / Ograničenje temperature / Ограничение температуры / Температураны шектеу / Dozvoljena temperatura



Batch Code (Lot) / Kód (číslo) šarže / Batch code (Lot) / Chargenummer (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 (seria) / Código do lote (Lote) / Kód série (šarža) / Código de lote (Lote) / Satskod (parti) / Код (Партида) / Număr lot (Lotul) / Parti Kodu (Lot) / Kod serije / Код партии (lot) / Топтама коды / Lot (kod)



Contains sufficient for <n> tests / Dostatečné množství pro <n> testů / Inneholder tilstrækkeligt til <n> test / Voldoende voor <n> tests / Küllaldane <n> testide jaoks / Sisältöön riittävä <n> testejä varten / Contenu suffisant pour <n> tests / Ausreichend für <n> Tests / Περιέχει επαρκή ποσότητα <n> εξετάσεις / <n> teszthez elegendő / Contenu suffisante per <n> test / Pakankamas kiekis atlikti <n> testų / Innholder 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 / Съдържанието 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(a) / <n> тесттери 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 upute za upotrebu / См. руководство по эксплуатации / Пайдалану нұсқаулығымен танысып алыңыз / Koristi

**CONTROL +**

Positive control / Pozitivní kontrola / Positiv kontrol / Positieve controle / Positivne kontroll / Positiivinkontrolli / Contrôle positif / Positive Kontrolle / θετικός έλεγχος / Pozitiv kontroll / Controllo positivo / Teigiama kontrolė / Positiv kontroll / Kontrola dodatnia / Controllo positivo / Pozitivna kontrola / Control positivo / Положителен контрол / Etalon pozitiv / Pozitif kontrol / Pozitivna kontrola / Положительный контроль / Жатымды бақылау

**CONTROL -**

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







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



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

MILLIPORE is a trademark of Millipore Corporation.

BD, BD Logo, Directigen and Macro-Vue are trademarks of Becton, Dickinson and Company © 2010 BD.