

INVASIVE CANDIDIASIS (CAGTA) IFA IgG

Für die *In vitro* diagnostik

PCAALG: Kit für indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen Antigene auf der Zellwandoberfläche der Myzelphase von *Candida albicans* (CAGTA *Candida albicans* germ tube antibody) in menschlichem Serum/Plasma.

EINLEITUNG:

Die invasive Candidose ist eine Krankheit mit Pilzätiologie, die zunehmende Inzidenz aufweist und dabei vor allem immungefährdete, lange ins Krankenhaus eingewiesene Patienten (mit Transplantation, Neutropenie, AIDS-Kranke usw.), ausgedehnter Chirurgie unterzogene Patienten mit Katheder oder Sonde und einer Breitbandantibiotikatherapie folgende Patienten betrifft. Die Diagnose der invasiven Candidose weist ernsthafte Probleme auf, die vor allem dem Ausbleiben pathognomonischer Krankheitssymptome und der schwierigen Isolation des Pilzes auf Hämokulturen assoziiert ist. Bislang im Handel erhältliche Diagnosetechniken der invasiven Candidose weisen eine geringe Spezifität und Sensibilität auf und einige davon weisen eine Durchführungsschwierigkeit auf, die ihren Einsatz in Labors für klinischen Mikrobiologielabors unmöglich macht. Zur Behebung dieser Probleme wurde eine serologische Diagnosetechnik der invasiven Candidose entwickelt, die auf dem Nachweis spezifischer Antikörper gegen Antigene der Zellwandoberfläche der Myzelphase von *Candida albicans* beruht (CAGTA *Candida albicans* germ tube antibody). Diese Antikörper sind im Serum von Patienten mit invasiver Candidose aufzufinden, die durch *C. albicans* oder andere Spezies der Gattung *Candida* verursacht wurde. Dieser Test wird nach der Beseitigung anderer Antikörper gegen diesen Pilz, die aufgrund ihres Auftretens in der Mehrzahl der Humansera zu falschen positiven Ergebnissen führen, durch indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Der entwickelte Test erfordert keine ausgeklügelte Infrastruktur und gestattet in 3 Stunden die Erzielung des Ergebnisses.

PRINZIP DES TESTS:

Die Methode der indirekten Immunfluoreszenz basiert auf der Reaktion der Antikörper der Probe mit dem an die Oberfläche des Objektträgers gebundenen Antigen. In der Probe vorhandene spezifische Antikörper reagieren mit dem Antigen, nicht-bindende Immunglobuline werden im Waschprozess beseitigt. Im nächsten Schritt reagiert der Antigen-Antikörper-Komplex mit Fluorescein- markiertem Antihumanglobulin und wird durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht.

EIGENSCHAFTEN DES KITS:

Alle Reagenzien mit Ausnahme von PBS werden gebrauchsfertig geliefert. Die Kit-Bestandteile sind zur leichteren eindeutigen Identifizierung mit einer Nummer versehen. Im Versuchsverfahren werden die Nummern der in jedem Abschnitt zu verwendenden Reagenzien angegeben.

BESTANDTEILE DES KITS:

- 1 VIRCELL CANDIDA ALBICANS SLIDE: 10 Objektträger zu je 10 Feldern mit *C. albicans* gewachsen auf Sabouraud-Nährboden, durch Wärme passiviert und mit Aceton fixiert.
- 2 VIRCELL PBS: 1 Ampulle zur Zubereitung von 1 l PBS pH 7,2.
- 3 VIRCELL CANDIDA IgG POSITIVE CONTROL: 200 µl positives Testserum für IgG (enthält Natriumazid).
- 4 VIRCELL CANDIDA NEGATIVE CONTROL: 200 µl negative Testserum (enthält Natriumazid).
- 5 VIRCELL ANTI-HUMAN IgG FITC CONJUGATE: 2 Ampullen mit 1,1 ml Fluorescein-markiertem Anti-Human-IgG-Konjugat in Phosphatpuffer mit Eiweißstabilisator, Evans-Blau und Natriumazid.
- 6 VIRCELL MOUNTING MEDIUM: 3 ml Eindeckmedium: gepuffertes Glycerol (enthält Natriumazid).
- 7 VIRCELL CANDIDA SORBENT: 3 Ampullen zu 1,4 ml durch Wärme passivierte Hefephase von *C. albicans* (enthält Natriumazid).

Bei 2-8°C lagern, Verfallsdatum überprüfen

Zusätzlich benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:

Geeignete Präzisionspipetten.
Inkubator/temperierbares Bad.
Destilliertes Wasser.
24x60 mm großes Objektdeckglas.
Fluoreszenzmikroskop und nach Herstellerempfehlungen geeignete Filter.
Feuchte Kammer.
Tischzentrifuge.

LAGERBEDINGUNGEN:

Das Kit ist bei der angegebenen Temperatur bis zum Verfallsdatum stabil. Verwenden Sie die Komponenten des Kits nicht mehr nach Ablauf des Verfalldatums. Das angegebene Verfalldatum gilt immer dann, wenn die Komponenten geschlossen bei der angegebenen Temperatur gelagert werden.

LAGERUNG DER ANGEBROCHENEN REAGENZIEN:

Reagenz	Stabilität
Rekonstituierte PBS	4 Monate bei 2-8°C, stets innerhalb des Verfalldatums
VIRCELL SLIDE	Nach dem Öffnen am gleichen Tag verwenden
Übrige Bestandteile	Datumsangabe auf Verpackung bei 2-8°C

STABILITÄT UND HANDHABUNG DER REAGENZIEN:

Alle Reagenzien zur Vermeidung mikrobiischer Verunreinigungen unter aseptischen Bedingungen verwenden. Nur zur Testdurchführung erforderliche Menge an PBS, Kontrollen und Konjugat benutzen. Restliche Lösung niemals in die Ampullen zurückgeben. Die PBS muss nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C gelagert und darf bei Trübung nicht verwendet werden.

VIRCELL, S.L. ist nicht verantwortlich für Fehler, die durch eine falsche Handhabung der Reagenzien dieses Kits verursacht wurden.



EMPFEHLUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN:

1. Einsatz ausschließlich für *in-vitro* diagnostische Zwecke. Nur für den professionellen Einsatz.
2. Nur Kit-Bestandteile verwenden. Reagenzien aus Kits unterschiedlicher Chargennummer oder von anderen Herstellern dürfen nicht verwendet werden. Nur PBS, Objektträger und Eindeckmedium sind zu gleichwertigen Substanzen anderer Artikelnummern und Chargen von IFA VIRCELL kompatibel. Die übrigen Bestandteile sind unter verschiedenen Kits kompatibel, wenn deren Chargennummer übereinstimmt.
3. Für jeden Testschritt neue Pipettenspitzen verwenden. Nur sauberes, vorzugsweise Einweg-Material verwenden.
4. Keine beschädigten Kits verwenden.
5. Nicht mit dem Mund pipettieren.
6. Konjugat und Kontrollen dieses Kits enthalten Material tierischen Ursprungs. Die Kontrollen enthalten zudem Substanzen humanen Ursprungs. Obwohl die Humanserum-Kontrollen dieses Kits auf Hepatitis B Oberflächen Antigen (HBsAg), Hepatitis C Antikörper und Human Immunodeficiency Virus Antikörper getestet und für negativ befunden wurden, sollten Kontrollseren und Patientenproben als potentiell infektiös angesehen und entsprechend behandelt werden. Die Vertiefungen der Titerplatte und sorbent sind mit inaktiviertem Antigen von *C. albicans* beschichtet. Trotzdem sollten auch sie als potentiell infektiös angesehen und mit der nötigen Vorsicht behandelt werden. Gegenwärtig kann keine Methode eine vollständige Abwesenheit von infektiösen Bestandteilen versichern. Alle Materialien sollten wie potentiell infektiöse Stoffe entsorgt werden. Beachten Sie die örtlichen Bestimmungen für die Entsorgung von klinischem Material.
7. Aufgrund des Natriumazidgehalts (Konzentration <0,1%) ist der Kontakt von Konjugat, Eindeckmedium und Kontrollen mit Säuren und Schwermetallen zu vermeiden.
8. Aufgrund des Glycerolgehalts ist der Kontakt des Eindeckmediums mit Säuren zu vermeiden. Keinen hohen Temperaturen aussetzen.
9. Evans-Blau (Konzentration <0,1%) ist krebserregend. Haut- und Augenkontakt vermeiden. Betroffene Fläche bei Kontakt mit Wasser abwaschen und einen Arzt rufen.
10. Nur die in diesem Prospekt beschriebenen Protokolle benutzen. Entsprechen die in diesem Test eingesetzten Inkubationsintervalle oder -temperaturen nicht den Angaben, können die Ergebnisse fehlerhaft sein.
11. Die Kreuzverunreinigung durch Serum verschiedener Patienten auf einem Objektträger kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Zur Vorbeugung erforderliche Vorkehrungen treffen.
12. Die Optik des Mikroskops, die Wartung und die Art der Lichtquelle können die Fluoreszenzqualität beeinträchtigen.
13. Reagenzien nicht länger als unbedingt erforderlich Raumtemperatur aussetzen.
14. Jeder Objektträger ist nur einmal zu benutzen. Er darf weder geteilt, noch dürfen unbenutzte Felder wiederverwendet werden.
15. Das Kit enthält Glaselemente, die bei Bruch zu Körperverletzungen führen können. Vorsichtig damit umgehen.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG:

Das Blut muss unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktionstechniken von erfahrenem Personal entnommen werden. Zur Vermeidung von Probenverunreinigungen wird der Einsatz aseptischer oder steriler Techniken empfohlen. Die Sera sind bei 2-8°C gekühlt zu lagern, wenn sie innerhalb der sieben auf die Entnahme folgenden Tage verarbeitet werden. Verzögert sich die Verarbeitung, sind sie bei -20°C einzufrieren, wobei unnötiges Einfrieren und Auftauen vermieden werden sollte, da dies zu einer Verringerung des Immunglobulintiters und insbesondere von IgM führen könnte. Keine hyperlipämischen oder verunreinigten Sera verwenden. Partikel aufweisende Sera können durch Zentrifugieren geklärt werden.

TESTVORBEREITUNG:

Das einzige vor der Testdurchführung vorzubereitende Reagenz ist die PBS. Hierfür den Inhalt von Ampulle 2 auf 1 Liter destilliertes Wasser zugeben und bis zur vollständigen Auflösung schütteln. Nach erfolgter Zubereitung bei 2-8°C aufbewahren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Reagenzien und Objektträger vor deren Öffnung auf Raumtemperatur bringen.
2. 1/4-Verdünnung der Sera vornehmen, hierfür 10 µl Serum in 30 µl PBS 2 geben; als 1/4. Stellen Sie in gesonderten Röhrchen Aliquots der Hefephase von *C. albicans* (VIRCELL CANDIDA SORBENT) 7 mit je 80 µl pro Röhrchen her. Fügen Sie zu jedem dieser Röhrchen je 20 µl der Serumverdünnung hinzu, schütteln und kennzeichnen (1/20-Verdünnung). 1 Stunde lang bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubieren. 5 Minuten lang bei 700 g abschleudern. Überstehende Lösung abscheiden. Lösung beschriften, mit 50 µl PBS 2 (bis zur Verdünnung 1/160-Lösung) doppelt verdünnen. Die Testsera 3 und 4 dürfen nicht verdünnt werden noch absorbiert.
3. In jedes Felder von Objektträger 1 20 µl der Verdünnungen in die entsprechenden Felder geben. Ebenso mit den Positiv- und Negativ-Kontrollen 3 und 4 verfahren.
4. 30 Minuten lang bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren.
5. Objektträger kurz mit PBS spülen (vermeiden, PBS direkt auf die Felder zu schütten). Objektträger 10 Minuten lang in PBS tauchen. Leicht mit destilliertem Wasser spülen.
6. Objektträger 1 abtrocknen lassen.
7. Auf jedes Feld 20 µl Anti-Human-IgG-Lösung 5G zugeben. (Erfordert keine Verdünnung).
8. Schritte 4, 5 und 6 wiederholen.
9. Auf jedes Feld einen kleinen Tropfen Eindeckmedium 6 zugeben und Deckglas aufsetzen.
10. So schnell wie möglich bei 400x Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersuchen. Andernfalls bis zur Betrachtung höchstens 24 Stunden lang bei 2-8°C dunkel lagern.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE:

Jede Charge wird einer internen Qualitätskontrolle unterzogen, bevor einer Freigabe unter Spezifikationen zugestimmt wird, die strenger als die für den Anwender sind. Die endgültigen Ergebnisse der Qualitätskontrolle jedes einzelnen Artikels sind erhältlich.

Dem Kontrollmaterial liegen als Referenz nachweislich intern geprüfte Serumplatten zugrunde.



TEST-VALIDIERUNG FÜR ANWENDER:

In jeden Versuchsdurchgang sollte das positive und negative Testserum aufgenommen werden. Das gestattet die Validierung des Tests und des Kits. Das vorhandene Fluoreszenzmuster sollte folgendermaßen aussehen:

Positive Kontrolle: Apfelgrüne Fluoreszenz auf der Myzelphase, wobei die Hefen rot bleiben.

Negative Kontrolle: Rote Zellschablone, das Myzel und Hefephase einschließen muss.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Der Serumtiter ergibt sich aus der höchsten Verdünnung, bei der eine positive Reaktion festzustellen ist.

Die Reaktion ist positiv, wenn apfelgrüne Fluoreszenz auf der Myzelphase, wobei die Hefen rot bleiben festgestellt wird.

Die Reaktion ist negativ, wenn ein rotes Zellmuster, das Myzel und Hefephase einschließen muss festgestellt wird.

Enthält das Serum viele Antihefe-Antikörper kann es vorkommen, dass bei niedrigen Verdünnungen auch etwas Fluoreszenz auf der Hefe zu sehen ist, doch muss der Antikörpertiter unter lediglicher Berücksichtigung der Reaktivität der Myzelphase nachgewiesen werden. Sind bei allen Verdünnungen Antihefe-Antikörper zu sehen, muss das Serum erneut absorbiert werden. Das Auftreten von Antikörpern bei Titer größer gleich 1/160 wird als für invasive Candidose verdächtig angesehen.

Von den in der dieser Beilage definierten Fluoreszenzmustern abweichende Ergebnisse dürfen nicht als positiv interpretiert werden.

EINSCHRÄNKUNGEN:

1. Der Kit ist für die Untersuchung von humanem Serum/Plasma.
2. Dem Anwender des Tests wird empfohlen, diese Gebrauchsanleitung vor der Testdurchführung sorgfältig zu lesen und die einzelnen Schritte nachzuvollziehen. Die strikte Einhaltung der Gebrauchsanleitung ist notwendig, um verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. Insbesondere das korrekte Pipettieren der Probe und der Reagenzien sowie sorgfältiges Waschen und die Einhaltung der angegebenen Inkubationszeiten sind für die Genauigkeit der Ergebnisse essenziell.
3. Die Ergebnisse der Proben sollten immer in Verbindung mit den klinischen Daten und anderen diagnostischen Ergebnissen interpretiert werden.
4. Dieser Test zeigt nicht den Infektionsort. Er kann eine Erregerisolierung nicht ersetzen.
5. Wenn kein signifikantes Ansteigen des Antikörper-Niveaus vorhanden ist, bedeutet dies nicht, dass eine Infektion ausgeschlossen werden kann.
6. Für die Diagnose einer Infektion sollten niemals nur die Ergebnisse der Antikörperbestimmung einer einzigen Probe herangezogen werden. Eine paarweise Testung der Proben (akut und latent) sollte erfolgen, um eine Serokonversion oder einen signifikanten Titeranstieg nachzuweisen.
7. Die angegebenen Testergebnisse entsprechen komparativen Studien mit kommerziellen prädikativen Produkten in einer definierten Bevölkerungsstichprobe. Es können kleine Unterschiede zwischen verschiedenen Bevölkerungen oder verschiedenen prädikativen Produkten bestehen.

LEISTUNGSDATEN:**• SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT:**

Gegenüber von der indirekten Antikörper-Immunfluoreszenz einer anderen Handelsfirma wurden 51-Serum/-Plasma-Proben mit INVASIVE CANDIDIASIS (CAGTA) IFA IgG getestet und dabei folgende Ergebnisse erzielt:

	Probe NR	Sensitivität	Spezifität
IgG	51	76%	96,2%

Die Sera, die keine spezifische Reaktion aufwiesen, wurden aus den Endberechnungen ausgeschlossen.

• INTRA-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurde 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und unter gleichen Arbeitsbedingungen einzeln in Fünfergruppen in einem einzigen von der gleichen Person durchgeführten Versuch pipettiert.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• INTER-ASSAY GENAUIGKEIT:

Es wurden 3 (2 positive und 1 negatives) Sera titriert und einzeln unter 5 verschiedenen Bedingungen pipettiert, bei denen sich die Person oder der Durchführungstag änderten.

In keinem Fall waren Schwankungen über 1 Titer festzustellen.

• KREUZREAKTIVITÄT UND INTERFERENZEN:

Gegenüber anderen Mikroorganismen (*Aspergillus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*) wurden 8 als positiv bekannte Proben ausgetestet.

Die getesteten Proben ergaben negative Ergebnisse und bewiesen dabei die spezifische Reaktion des Versuchs ohne von den beschriebenen Stoffen verursachte Kreuzreaktion oder Interferenzen.

BENUTZTE ETIKETTEN-SYMBOLS:

	Für die <i>In vitro</i> Diagnostik
	Verwendbar bis (Verfallsdatum)
	Bei x-γ°C lagern
	Inhalt ausreichend für <n> Bestimmungen
	Chargen-Nummer
	Bestell-Nummer
	Gebrauchsanleitung beachten
	<X> Vertiefungen



LITERATUR:

1. Bikandi, J., R. San Millan, P. Regulez, M. D. Moragues, G. Quindós, and J. Ponton. 1998. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes during experimental infections by different *Candida* species. *Clin Diagn Lab Immunol* 5:369-74.
2. Cuenca- Estrella, M. 2012. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad fúngica invasora. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30(5): 257-264.
3. García-Ruiz, J. C., M. del Carmen Arilla, P. Regulez, G. Quindós, A. Alvarez, and J. Ponton. 1997. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 35:3284-7.
4. Iruretagoyena, J.R., P. Regulez, G. Quindós, J. Pontón. 2000. Antibodies to *Candida albicans* germ tubes in two intensive care patients with invasive candidiasis. *Rev Iberoam Micol* 17: 93-96.
5. León, C. et al. 2012. Value of β -D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med* 38(8): 1315-25.
6. Linares, M. J., M. R. Javier, J. L. Villanueva, F. Solís, J. Torre-Cisneros, F. Rodríguez, J. M. Kindelan, and M. Casal. 2001. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes in heroin addicts with systemic candidiasis. *Clin Microbiol Infect* 7:218-26.
7. Moragues, M. D., Ortiz, Amutio, E., García-Ruiz, J. C. and Potón, J. 2003. Utilidad de la detección de galactomano en el diagnóstico y seguimiento de la aspergilosis invasora en pacientes hematológicos. *Rev Iberoam Micol* 20: 103-110.
8. Moragues, M. D., Ortiz, N., Ezkurra, P. A., Iruretagoyena, J. R., García-Ruiz, J. C., Amutio, E., Rojas, A., Mendoza, J., Quindós, G. and Pontón, J. 2003. Utilidad diagnóstica de la nueva técnica *Candida albicans* IFA IgG en la candidiasis invasora. *Rev Iberoam Micol* 20: S4.
9. Moragues, M. D., Ortiz, N., Iruretagoyena, J. R., García-Ruiz, J. C., Amutio, E., Rojas, A., Mendoza, J., Quindós, G. and Pontón-San Emeterio, J. 2004. Evaluación de una nueva técnica comercializada (*Candida albicans* IFA IgG) para el diagnóstico de la candidiasis invasiva. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22 (2): 83-88.
10. Pemán, J. and Zaragoza, R. 2009. Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care settings. *Mycoses* 53: 424 - 433
11. Ponton, J. and R. Cisterna. 1987. Es posible un diagnostico serologico rapido y especifico de la candidiasis sistémica? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 6:61-5.
12. Ponton, J. and J. M. Jones. 1986. Analysis of cell wall extracts of *Candida albicans* by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot techniques. *Infect Immun* 53:565-72.
13. Ponton, J. and J. M. Jones. 1986. Identification of two germ-tube-specific cell wall antigens of *Candida albicans*. *Infect Immun* 54:864-8.
14. Ponton, J., A. Marot-Leblond, P. A. Ezkurra, B. Barturen, R. Robert, and J. M. Senet. 1993. Characterization of *Candida albicans* cell wall antigens with monoclonal antibodies. *Infect Immun* 61 :4842-7.
15. Ponton, J., G. Quindós, M. C. Arilla, and D. W. Mackenzie. 1994. Simplified adsorption method for detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes. *J Clin Microbiol* 32:217-9.
16. Quindós, G., J. Ponton, and R. Cisterna. 1987. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol* 6:142-6.
17. Quindós, G., J. Ponton, R. Cisterna, and D. W. Mackenzie. 1990. Value of detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9:178-83.
18. Quindós, G., Moragues, M. D. and Pontón, J. 2004. Is there a role for antibody testing in the diagnosis of invasive candidiasis? *Rev Iberoam Micol* 21: 10-14.
19. Sandven P. 2000. Epidemiology of candidemia. *Rev Iberoam Micol* 17:73-81.
20. Wulf, G. G., Conradi, I. and Rùchel, R. 2004. Diagnostic value of antibody detection against *Candida* germ tube antigens in a patient with hepatosplenic candidosis. *Mycoses* 47, (Suppl. 1): 11-14.
21. Zaragoza, R., Pemán, J., Quindós, G., Iruretagoyena, J.R., Cuétara, M.S., Ramírez, P., Gómez, M.D., Camarena, J.J., Viudes, A. and Pontón, J. 2008. Clinical significance of the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibodies in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect*. 15: 592 – 595.
22. Zaragoza, R. et al. 2009. Kinetic Patterns of *Candida albicans* Germ Tube Antibody in Critically Ill Patients: Influence on Mortality. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16: 1527-1528.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

customerservice@vircell.com

ÜBERPRÜFT: 2020-03-23

L-PCAALG-DE-01

