

Cryptococcus Antigen Latex Test

R30851501 – 60 testes

Cryptococcus Antigen Latex Test é um teste simples, qualitativo ou semiquantitativo, que detecta a presença de antígenos de *Cryptococcus neoformans* em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro.

- Resultados rápidos (5 min.), com alta especificidade
- Controle negativo e dois controles positivos: para altas e baixas concentrações de antígenos
- Protease: evita a aglutinação inespecífica do látex

INSTRUÇÕES DE USO

Cryptococcus Antigen Latex Test CÓDIGO R30851501 (50 Testes)

Teste de aglutinação de látex para detecção de antígeno de *Cryptococcus neoformans*.

INTRODUÇÃO

Remel *Cryptococcus Antigen Latex Test* é um teste simples, qualitativo ou semiquantitativo, que em 5 minutos detecta antígenos polissacarídeos associados a infecções por *Cryptococcus neoformans*. Amostras de soro ou líquido cefalorraquidiano (LCR) podem ser utilizadas.

RESUMO

A criptococose é uma infecção sistêmica causada por fungos, *C. neoformans*. Solo e fezes de aves são reservatórios naturais para *C. neoformans*. A inalação de esporos desses fungos pode levar a infecções do pulmão e a possibilidade de sua disseminação. Pacientes com a doença, especialmente imunocomprometidos, pode apresentar um debilitado devastadora uma vez que este microrganismo tem uma incommum afinidade com tecidos do sistema nervosa central. Criptococose é reportada como sendo a quarta infecção mais comum em pacientes imunocomprometidos; portanto a precoce detecção é essencial.¹

Em 1963, Bloomfield demonstrou a detecção do antígeno polissacarídeo criptococo (CPS) no soro e LCR de pacientes com infecção por *C. neoformans* usando a metodologia de látex teste.² Desde então, aglutinação do látex tem sido demonstrada como um método específico, e sensível para a rápida detecção da presença de CPS no soro, fluido espinal e urina.^{3,4}

Preocupações têm sido expressadas com relação ao uso de látex testes. Entre elas estão:

1. Aglutinação não específica do látex sensibilizado pelo anticorpo anticriptococo de coelho pelo fator reumatóide nas amostras de soro.
2. Formação de imunocomplexos entre o antígeno polissacarídeo e o anticorpo humano, o qual pode mascarar o antígeno e impedir seu reconhecimento pelas partículas sensibilizadas de látex.⁵

PRINCÍPIO

Cryptococcus Antigen Latex Test incorpora o uso de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais IgM (camundongo). O uso de anticorpos monoclonais IgM e o tratamento do soro com protease reduz a possibilidade de reações falso positivas e elimina a necessidade de realizar uma prova de controle paralelo do teste para verificar a especificidade dos resultados do teste.^{5,6,7}

Concentrações detectáveis de CPS no soro ou LCR irá reagir com partículas sensibilizadas com de anticorpos monoclonais IgM para produzir uma aglutinação visível. A observação da aglutinação demonstra um resultado positivo e se deve suspetar da presença de CPS na amostra do paciente.

REAGENTES

Componentes do Kit

1. Látex Teste
1 frasco contendo 2,5 ml de suspensão de partícula de látex brancas, sensibilizadas com anticorpo monoclonal IgM anti-CPS, suspensas em solução tampão e conservadas em titerosal sol. 0,01%.
2. Controle Negativo
1 frasco contendo 0,8 ml de soro humano, diluído em tampão conservado com azida sódica a 0,1%.
3. Controle Positivo (alto)
1 frasco contendo 0,8 ml de antígeno CPS de *C. neoformans* (50ng/ml), conservado/inativado com azida sódica a 0,1%.
4. Controle Positivo (baixo)
1 frasco contendo 0,8 ml de antígeno CPS de *C. neoformans* (12ng/ml), conservado/inativado com azida sódica a 0,1%.
5. Protease
1 tablete de enzima em uma ampola para ser reconstituída em 3 ml de diluente de amostra.
6. Diluente da Amostra
1 frasco contendo 10 ml de solução NaCl e glicina concentrada 10 x, conservada com azida sódica a 0,1%.
7. Cartões de Reação (descartáveis)
1 pacote (12 cartões com 6 áreas de reação cada)
8. Pipetas Plásticas (descartáveis)
1 pacote (50 unidades)
9. Instruções de Uso
1 unidade

MATERIAIS NECESSARIOS MAS NÃO FORNECIDOS:

- (1) Agitador com capacidade entre 100 - 110 rpm
- (2) Pipetas graduadas ou micropipetas para diluição seriadas das amostras
- (3) Tubos de diluição (12 x 75 mm)
- (4) Cronômetro
- (5) Caneta de laboratório
- (6) Banho de fervura
- (7) Frasco volumétrico
- (8) Água desmineralizada
- (9) Frasco tampa de rosca para estocar diluente preparado

MATERIAS OPCIONAIS

- (1) Lâmpada de alta intensidade
- (2) Centrífuga

PRECAUÇÕES

Este produto se destina apenas a uso em diagnóstico e deve ser usado por indivíduos treinados. Precauções devem ser tomadas contra perigos ao se manipular material biológico como por exemplo, a esterilização de amostras, recipientes e demais materiais do teste após o uso. Instruções devem ser lidas e seguidas cuidadosamente.

PRECAUÇÕES DE SEGURANÇA

1. Material com Potencial de Risco Biológico: o soro humano usado para fabricar o Controle Negativo foi demonstrado não ser reagente para a presença de antígeno da hepatite B (HBsAg) e anticorpos de HIV e HCV usando metodologia FDA. Devido a nenhum teste poder assegurar a ausência de todos agentes infecciosos, qualquer amostra humana deve ser manuseada como potencialmente infecciosa.
2. Os controles Negativo, Positivo (alto) e Positivo (baixo) contém azida sódica a 0,1%, a qual é prejudicial se ingerida. O diluente de amostra contém 1,0% de azida sódica, a qual é tóxica se ingerida. Contato com azida sódica pode liberar gases tóxicos. Este reagente é tóxico para o ambiente aquático e pode causar efeito em longo prazo. Pode ainda reagir com cobre e formar metal de azida explosiva em contato com tubulações. Ao dispensar os reagentes na pia, liberar água corrente em abundância para prevenir formação de metais de azida.
3. Consultar Fichas de Segurança para maiores detalhes de reagentes químicos.

ARMAZENAGEM

Armazenar todos os reagentes entre 2-8°C. Levar todos os reagentes para temperatura ambiente antes do uso. NÃO CONGELAR nenhum reagente. Evitar temperaturas extremas.

NÃO DILUIR o Látex Teste ou os reagentes Controles.

NÃO usar reagentes de diferentes lotes entre si.

DETERIORAÇÃO DO PRODUTO

Este produto não deve ser usado se (1) a aparência dos reagentes sofrer alteração, (2) após o prazo de validade ou (3) apresentar sinais de deterioração.

O Látex Teste deve ter a aparência leitosa. Se alguma agregação for observada, que prejudique o processo de dispensar o reagente, após várias tentativas de inverter o frasco, não usar o reagente.

Controles Positivo e Negativo devem ter um aspecto transparente e claro.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E ARMAZENAGEM

Diluente de Amostra

O diluente de amostra é fornecido 10 x concentrado. Diluir este reagente 1 x da seguinte forma:

Misturar o conteúdo do frasco com 90ml de água desmineralizada. Uma vez preparado pode ser usado quando necessário ou estocado bem fechado entre 2-8°C até a data de validade em sua concentração original de 10 x.

Protease

Para dissolver a Protease, adicionar 3 ml do diluente de amostra preparado 1x. Escrever a data da reconstrução no rótulo do frasco. Deixar 30 minutos para completa reconstrução. Homogeneizar a ampola pelo menos duas vezes durante este período. A solução Protease pode ser estocada por um mês entre 2-8°C. Alternativamente, alíquotas da solução em tubos apropriados podem ser estocadas abaixo de -20°C até a data de validade do kit.

COLETA, PREPARAÇÃO E ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Amostras devem ser coletadas e manuseadas seguindo recomendações de Textos Padrão (guidelines).⁸ Soro deve ser separado do sangue coagulado e passado a um tubo limpo e etiquetado.

Amostras de soro ou LCR que mostrem hemólise ou que contenham grandes quantidades de suspensão devem ser centrifugadas antes do uso. Se a centrifugação não melhorar a qualidade das amostras ou se o volume não for suficiente para o teste, obter uma segunda amostra.

Armazenamento das Amostras

- 1- Se desejar acumular amostras para o teste, armazenar em tubos fechados e etiquetados, entre 2-8°C por até uma semana. Um conservante, como azida sódica (0,1%) ou Iimerosal (0,01%), pode ser adicionado.
- 2- Se forem necessários longos períodos de armazenagem as amostras podem ser congeladas abaixo de -20°C.
- 3- Se recomenda homogeneizar as amostras armazenadas e centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente para remover qualquer partícula antes do uso no teste.
- 4- Amostras devem ser imediatamente usadas após processadas.

Preparação das Amostras

- LCR:**
- 1- Ferver em banho (100°C) por 5 minutos
 - 2- Deixar estabilizar o conteúdo a temperatura ambiente
 - 3- Agitar em Vortex antes do teste

Soro: (tratar com Proteose)

- 1- Se necessário, diluir o diluente de amostra (10x) a concentração de trabalho (vide PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E ARMAZENAGEM)
- 2- Se necessário, reconstituir a protease com 3ml de diluente de amostra a 1x (vide PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E ARMAZENAGEM)
- 3- Dispensar entre 100 e 200µl de soro em um tubo e adicionar um volume igual de protease. Fechar o tubo e homogeneizar em Vortex.
- 4- Colocar o tubo fechado em banho (100°C) por 10 minutos
- 5- Esfriar a temperatura ambiente e homogeneizar antes do uso.

Nota: Se for observada floculação antes ou depois do tratamento com protease, centrifugar a amostra a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura. Utilizando uma pipeta ou micropipeta, decantar cuidadosamente o sobrenadante (50 µl) evitando aspirar o concentrado do fundo do tubo.

PROCEDIMENTO

Teste Quantitativo:

- 1- Ressuspender o Latex Teste invertendo rapidamente o frasco varias vezes. Manter o frasco em posição vertical e apertar o mesmo para liberar uma gota de latex em cada área de reação.
- 2- Usar as pipetas incluídas no kit, para dispensar uma gota de cada amostra tratada (aproximadamente 50 µl) nas áreas de reação para cada amostra a ser testada.
- 3- Com a parte superior achatada da pipeta, misturar bem. Dispensar a amostra e o Latex Teste por toda superfície da área de reação. Descartar a pipetas após este passo.
- 4- Colocar o cartão em um agitador com 100-110rpm por 10 minutos.

5- Imediatamente após a agitação, fazer movimentos giratórios com o cartão por 5 minutos. Inclinado para obter um padrão de fluido e examinar cada área para aglutinação (vide Resultados). Anotar os resultados e comparar a reação da amostra com a reação do controle negativo. Anotar os resultados.

Nota: Se for encontrados problemas para leitura da reação, utilizar luz de tungstênio de alta densidade para facilitar a interpretação dos resultados.

Teste Semi-Quantitativo de Amostras Positivas:

- 1- Se necessário, diluir o diluente de amostra (10x) a concentração de trabalho (vide PREPARAÇÃO DOS REAGENTES E ARMAZENAGEM)
- 2- Obter e marcar 8 tubos de 1 a 8. Adicionar 0,1 ml d diluente de amostra em cada tubo.
- 3- Adicionar 0,1ml de LCR tratado com calor ou soro tratado com protease (já em uma concentração de 1:2) ao tubo 1. Com uma pipeta limpa, misturar o conteúdo do tubo 1 e transferir 0,1ml ao tubo 2. Não misturar o conteúdo do tubo 2 com a pipeta.
- 4- Com uma pipeta limpa, misturar o conteúdo do tubo 2 e transferir 0,1ml ao tubo 3. Não Não misturar o conteúdo do tubo 3 com a pipeta.

- 5- Seguir este método para obter diluições seriadas da amostra com concentrações duplas até o tubo 8. As concentrações do soro estarão entre 1:4 a 1:512 nos tubos de 1 a 8 , respectivamente. Enquanto que o LCR se realizarão diluições de 1:2 a 1:256. O tubo 8 poderá ser mais diluído se o objetivo não for alcançado.

- 6- Testar cada diluição da amostra de acordo com o protocolo, descrito em Teste Quantitativo.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

1- Resultados do Teste Quantitativo:

Qualquer aglutinação ou clareamento do látex observado imediatamente após o movimento de 5 minutos rotação do cartão, deve ser considerado como resultado positivo.

Ausência de aglutinação do látex, deve ser considerado como resultado negativo

Nota: Podem ser detectados quantidades escassas de granulações nos resultados negativos, dependendo da acuidade visual do técnico.

2- Resultados do Teste Semi-Quantitativo:

Quando se examinam as amostras positivas com uma diluição seriada, o título é inverso a ultima diluição que produziu um resultado positivo (aglutinação).

CONTROLE DE QUALIDADE

Todos os lotes de Cryptococcus Antigen Latex Test são avaliados pelo laboratório de C.Q. Remel e têm sido considerados aprovados. Testes de Controle de Qualidade devem ser feitos e acordo com métodos e procedimentos de qualidade conhecidos. Se resultados anormais no controle de qualidade forem observados, não devem ser reportados.

- 1- Ressuspender o Latex Teste e os controles, invertendo rapidamente os frascos várias vezes antes do uso.
- 2- Dispensar 1 gota dos controles positivo alto, positivo baixo e negativo, na área de reação.
- 3- Dispensar 1 gota de Latex Teste bem homogeneizado, em cada uma das três áreas de reação.
- 4- Misturar bem e distribuir o conteúdo de cada área com a parte superior da pipeta limpa.
- 5- Colocar o cartão em um agitador com 100-110rpm por 5 minutos.
- 6- Imediatamente após a agitação, fazer movimentos giratórios com o cartão por 5 minutos. Inclinado para obter um padrão de fluido e examinar cada área para aglutinação (vide Resultados). Anotar os resultados e comparar a reação da amostra com a reação do controle negativo. Anotar os resultados.
- 7- Resultados esperados: Os controles positivo alto e baixo, devem aglutinar o Latex Teste de uma forma distinta:

- O Controle Positivo Alto deve mostrar uma aglutinação forte
- O Controle Positivo Baixo deve mostrar uma aglutinação mais fraca, mas visível.
- O Controle Negativo não deve mostrar nenhuma uma aglutinação, embora presença de traços de granulações sejam aceitáveis.
- 8- Se os resultados esperados não forem obtidos, interromper o uso do kit e contatar o Departamento Técnico Remel.

LIMITAÇÕES

- 1- Para as Instituições – Center for Disease Control and Prevention e Food and Drug Administration DA, a avaliação do testes de Cryptococcus Antigen Latex, segundo a classificação de testes CLIA se caracterizou como um teste de grande complexidade (CLIA 88: código de análise: 61136; código analítico 7604). Se o médico suspeitar de uma infecção por cryptococcus devido aos sintomas clínicos e uma amostra fornecse resultado negativo com o kit, a amostra tratada pode ser diluída 1:10 e refazer o teste. Se for observada aglutinação, anotar resultado positivo.
- 3- Os resultados do kit Cryptococcus Antigen Latex, devem ser avaliados com outros dados clínicos e analíticos. Foi demonstrado que *Trichosporon beigeli* produz uma reação cruzada com o antígeno polisacarídeo.
- 4- Foi demonstrado que o líquido de condensação na superfície do Agar das placas de cultivo, aglutinam as partículas de látex sensibilizadas.¹⁰ Testes de LCR contaminado com meio depois de incubar as placas de cultivo podem resultar em reações falso positivas.
- 5- O médico deve revisar os resultados analíticos com relação aos antecedentes do paciente.

VALORES ESPERADOS

Um resultado positivo ocorre quando a aglutinação do Latex Teste em combinação com a amostra do paciente é observada imediatamente após 5 minutos de rotação do cartão. Se nenhuma aglutinação ocorrer, o teste é considerado negativo.

Alguns pacientes HIV soro positivos retem CPS por longos períodos, o pode ser devido a multiplicação ativa dos fungos.¹¹ Nesses casos, uma titulação posterior da amostra pode ajudar a estabelecer um prognóstico da doença.^{11,12,13}

Pacientes HIV soro positivos têm demonstrado títulos entre 1:2 a 1:32.678.¹³ A magnitude do título não parece estar relacionado com a intensidade da infecção, mas se considera útil para o diagnóstico dos pacientes que têm uma infecção criptocócica neurological disseminada.¹⁴ Entretanto, títulos superiores a 1:10.000 em paciente com AIDS estão associados com 100% de mortalidade.¹⁵

CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Remel Cryptococcus Antigen Latex Test demonstrou não reação com 60 amostras de soro tratado com proteose, selecionadas aleatoriamente, as quais eram negativas para antígeno cryptococcus. Entre esses soros estavam o preparado de referência RF (1000 IU/ml) da Instituição Centers for Disease Control and Prevention, muitos soros positivos de tecido conjuntivo, o fator reumatóide e rubéola e outras amostras que continham anticorpos inespecíficos. O fato de o kit Cryptococcus Antigen Latex Test não ter sido reativo com estas várias amostras simplifica o método devido (1) eliminar a necessidade do uso de látex controle e (2) reduzir testes redundantes e conservar o volume de amostras.

Um estudo independente foi feito para uma avaliação clínica comparativa em um laboratório de bacteriologia, associado a um grande hospital. O laboratório avaliou um total de 595 amostras de soro e LCR com o kit Remel Cryptococcus Antigen Latex Test e outro kit comercial por látex. Todas as amostras foram processadas seguindo as instruções de uso dos fabricantes. Com base nos resultados, a sensibilidade e especificidade do kit foram 100%. A determinação posterior do título de cada amostra foi mais favorável ao kit Cryptococcus Antigen Latex Test. Além desses resultados, os resultados foram mais fáceis de serem interpretados utilizando o kit Cryptococcus Antigen Latex Test.¹⁶

		Remel Cryptococcus Antigen Latex Test	
		+	-
Outro Latex Kit	+	68	2*
	-	0	525




*Nota: Ambos resultados discrepantes tiveram um título 1:2 liter para o outro kit, foram negativos para cultura e foram julgados inválidos.

Estudos de reprodutibilidade em dois diferentes centros e maiores que três dias, com 6 amostras em cada um dos dias utilizando Cryptococcus Antigen Latex Test e outro kit comercial por látex, indicou que não se produziu uma diferença maior que uma diluição de tubo entre ambos kits.

BIBLIOGRAFIA

1. Patterson, T.F., and V.T. Andreoli. 1989. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8:457-465.
2. Bloomfield, N., M.A. Gordon, and D.F. Elmendorf, Jr. 1963. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114:64-67.
3. Kaufmann, L. and S. Blumer. 1977. Proceedings of the 4th International Conference on the Mycoses, Pan American Health Organization, Scientific Publications No. 356:176-182.
4. Pincus, D.H., I.F. Salkin, and M.R. McGinnis. 1988. Lab. Med. 19:315-320.
5. Hamilton, J.R., A. Nobel, D.W. Denning, and D.A. Stevens. 1991. J. Clin. Microbiol. 29:333-339.
6. Gray, L.D. and G.D. Roberts. 1988. J. Clin. Microbiol. 26:2450-2451.
7. Teitsson, L., R.H. Withington, M.H. Seifert, and H. Valdimarsson. 1984. Ann. Rheum. Dis. 43:673-678.
8. Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Tenover, M.A. Tenover, and R.H. Tenover. 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th ed., Vol. 1. ASM, Washington, D.C.
9. Melcher, G.P., K.D. Reed, M. G. Rinaldi, J.W. Lee, P.A. Pizzo, and T.J. Walsh. 1991. J. Clin. Microbiol. 29:192-196.
10. Boom, W.H., D.J. Piper, K.L. Ruoff, and M.J. Ferraro. 1985. J. Clin. Microbiol. 22:856-857.
11. Eng, R.H.K., E. Bishur, S.M. Smith, and R. Kapila. 1986. Am. J. Med. 81:19-23.
12. Dimech, W.J. 1991. Aust. J. Med. Lab. Sci. 12:13-21.
13. Asznowitz, R., J.H. Newton, and J. Kaldor. 1979. Med. J. Aust. 1:347-349.
14. Kovacs, J.A., A.A. Kovacs, M. Polis, et al. 1985. Ann. Intern. Med. 103:533-538.
15. Chuck, S.L. and M.A. Sande. 1989. N. Engl. J. Med. 321:794-798.
16. Howell, D., D. Orkiszewski, and P. Gilligan. 1983. Abstract C-160. Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology, ASM, Washington, D.C.
17. Data on File. Remel Inc., Lenexa, KS.

Legenda dos Símbolos

REF	Número do Catálogo
IVD	Uso em diagnóstico <i>In Vitro</i>
LAB	Uso em laboratório
	Vide bula
	Temperatura de Estocagem
LOT	Número do lote
	validade
EC	Comunidade Europeia



EDIÇÃO INSTRUÇÃO DE USO: MAIO/2005

LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E VALIDADE: VIDE RÓTULOS DOS FRASCOS E KIT