

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Enzýmový imunotest na diagnózu aspergilózy spôsobenej druhom *Aspergillus fumigatus*

96 testov v individuálnych testovacích jamkách

Návod na použitie pre artikkel č. 6100
EC reg. zn.: CH-201301-0006



Plánované použitie:

Sérologická diagnóza (IgG) aspergilózy.
Sledovanie pacientov s rizikom infekcie aspergilózy.

Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na mikrotitračných platničkách senzitivovaných týmito látkami:

- rozpustné somatické a metabolické antigény *Aspergillus fumigatus*,
- rekombinantné antigény: dipeptidyl peptidázy typu V (chymotrypsín) a ribonukleáza (mitogilín) druhu *Aspergillus fumigatus*.

Prítomnosť séra protilátok špecifických pre parazity je detekovaná proteínom A – konjugátom alkalickéj fosfatázy. Senzitivované platničky sú dodávané v podobe odlúčiteľných prúžkov pre úsporné testovanie malých sérií vzoriek.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	6100-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované antigénmi <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	jamky
DILB	6100-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x)	50	ml
WASH	6100-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	6100-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
STOP	6100-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negatívne kontrolné sérum	200	μl
CONTROL -/+	6100-07	Slabé pozitívne sérum (s medznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	6100-08	Pozitívne kontrolné sérum	200	μl
CONJ	6100-09	Proteín A – konjugát alkalickéj fosfatázy	300	μl
SUBS	6100-10	Substrát fosfatázy	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Súpravu skladujte pri teplote 2° až 8° C (preprava pri teplote okolia). Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule.

Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and μ l). Banky. Skúmavky na riedenie séra. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37° C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm.

Príprava reagentov pred použitím:

Jamky ELISA: otvorte hliníkovú tašku 6100-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek. Umiestnite senzitizedované jamky do 8-jamkového držiaka. Ak je to potrebné, zaplňte prázdne miesta v držiaku použitými jamkami. Vložte držiak(y) do podstavca v správnom smere. Znovu uzavrite otvorené balenie s použitím vysúšacieho vankúšika.

Tlmivý riediaci roztok: rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 6100-02, v destilovanej vode v pomere 1/10.

Premývací roztok: rozriedte koncentrát premývacieho roztoku (10 x) 6100-03, v destilovanej vode v pomere 1/10. Môžete použiť aj váš vlastný premývací roztok. Vyhnite sa roztokom obsahujúcim fosfáty, ktoré by mohli brániť enzymatickej aktivite alkalickej fosfatázy.

Negatívne, slabé pozitívne (s medznou hodnotou) a pozitívne **kontrolné séra:** rozriedte 10 μ l kontrolných sér 6100-06 až -08 v 190 μ l tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20).

Séra, ktoré budú testované: rozriedte 10 μ l séra v 2.0 ml tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/201).

Proteín A – **konjugát** alkalickej fosfatázy: rozriedte konjugát 6100-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/51).

Roztok substrátu: predhrejte enzymový tlmivý roztok 6100-04 na teplotu okolia. Predtým než nalejete substrát do ELISA jamiek, rozpustite tablety substrátu fosfatázy 6100-10 v neriedenom tlmivom roztoku 6100-04 (1 tableta v 2.5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí.

Zastavovací roztok: použite reagent 6100-05, nezriedený.



Upozornenie a prevencia: Roztoky 6100-02, 6100-03, 6100-04 a 6100-09 obsahujú v danom poradí 0.1%, 0.05%, 0.01% a 0.1% azidu sodného (N_3Na). Roztok 6100-02 obsahuje 0.02% merthiolátu. Tieto látky sú toxické. Zastavovací roztok 6100-05 (0.5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (6100-06 až -08) sú z králikov.

Objemy potrebné pripraviť:

			Celkový počet jamiek, ktoré budú použité			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlmivý roztok (10 x)	6100-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Premývací roztok (10 x)	6100-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	6100-09 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolné séra	6100-06 až -08 + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Séra, ktoré budú testované	Sérum + tlmivý roztok	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Roztok substrátu	6100-10 + 6100-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Postup:

Krok 1: Blokácia:

Jamky kompletne naplňte tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote okolia (blokácia).

Odstráňte tlmivý roztok buď odsávaním alebo vytrasením prúžkov nad umývadlom.

Krok 2: Inkubácia vzoriek séra:

Naplňte prvú jamku prvého prúžku 100 µl tlmivého roztoku (vzorka bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra v danom poradí (100 µl každá).

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými sérami, ktoré budú testované (100 µl každá).

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného proteínu A - konjugátu alkalickéj fosfatázy do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Odstráňte séra a 4 x opláchnite premývacím roztokom.

Krok 4: Inkubácia so substrátom:

Rozdeľte 100 µl roztoku substrátu do každej jamky.

Prikryte jamky samolepiacou páskou a inkubujte po dobu 30 minút pri 37° C.

Inhibujte reakciu pridaním 100 µl zastavovacieho roztoku do každej jamky.

Krok 5: Meranie absorbancie:

Utrite dná jamiek, odstráňte bubliny a merajte absorbanciu pri 405 nm.

Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá: absorbanca (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1.200, A negatívnej kontrolnej vzorky < 10 % A pozitívnej kontrolnej vzorky, A vzorky bez séra proti vzduchu < 0.350.

Koncentrácia protilátok slabého pozitívneho séra (s medznou hodnotou) 6100-07 bola nastavená tak, aby optimálne rozlišovala medzi sérami klinicky zdokumentovaných prípadov aspergilózy u imunokompetentných pacientov a zdravým ľudským sérom.

Koeficient hraničnej hodnoty vzorky je po odpočítaní vzorky bez séra daný ako:

$$\text{Koeficient} = \frac{\text{Absorbancia vzorky}}{\text{Absorbancia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky nižšia než **1.0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Aspergillus fumigatus** klinicky zanedbateľná.

Šedá zóna predstavuje koeficient s hodnotou medzi **0.8 a 1.0**. V takomto prípade je vzorka považovaná za hraničnú a odporúča sa zopakovať test s tou istou vzorkou alebo s novým sérom toho istého pacienta, odobraným po 2-4 týždňoch.

Výsledok je **pozitívny**, keď je absorbanca analyzovanej vzorky vyššia než **1.0**. V takomto prípade je koncentrácia protilátok IgG oproti antigénom **Aspergillus fumigatus** považovaná za klinicky významnú. Tento výsledok vedie k aspergilóze alebo senzitivizácii aspergilózy.

V každom prípade musí byť výsledok v korelácii s rádioklinickými pozorovaniami pacienta.

V prípade pacientov s potlačenou imunitou sa odporúča vykonať test s detekciou antigénov *A. fumigatus* v sére.

Tento kvantitatívny a reprodukovateľný test umožňuje sledovanie sérologického vývoja daného pacienta.

Citlivosť a presnosť testu:

Citlivosť 97% bola spozorovaná pri 32 sérach 19 pacientov trpiacich aspergilózou (11 s chronickou nekrotizujúcou aspergilózou, 12 s aspergilómom, 2 s aspergillus sinusitis a 7 s alergickou bronchopulmonálnou aspergilózou). Citlivosť vo výške 22 % bola spozorovaná pri 9 sérach 5 pacientov trpiacich invazívnou aspergilózou.

Presnosť 98% bola spozorovaná pri 131 sérach 67 pacientov trpiacich respiračnými chorobami nespôsobenými druhom aspergillus (kandidóza, tuberkulóza, pneumocystóza, kryptokokóza, vírusový alebo bakteriálny zápal pľúc).

Opakovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra v 24 jamkách počas 1 testu.

Reprodukovateľnosť bola určená testovaním 2 vzoriek ľudského séra počas 10 rôznych testov.

	Opakovateľnosť		Reprodukovateľnosť	
	Vzorka 1	Vzorka 2	Vzorka 1	Vzorka 2
Priemer (absorbancia)	0.352	1.767	0.410	1.985
Štandardná odchýlka (absorbancia)	0.027	0.069	0.038	0.096
Variačný koeficient (%)	7.6	3.9	9.3	4.8

Odkazy na použitú literatúru:

Weig, M., Frosch, M., Tintelnot, K., Haas, A., Gross, U., Linsmeier, B. and Heesemann, J. (2001) Use of Recombinant Mitogillin for Improved Serodiagnosis of Aspergillus fumigatus –Associated diseases. J. Clin. Microbiol. **39**, 1721-1730.

Sarfati, S., Monod, M., Recco, P., Sulahian, A., Pinel, C., Candolfi, E., Fontaine, T., Debeaupuis, J.P., Tabouret, M., Latgé, J.P. (2006) Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. Diag. Microbiol. Inf. Disease **55**, 279-291.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA
Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

