

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Enzymatický imunologický test pro diagnózu aspergilózy způsobené *Aspergillus fumigatus*

96 analýz na jednotlivých testovacích destičkách pro použití in vitro

Pokyny k použití pro produkt č. **6100**
Reg. č. ES: CH-201301-0006



Zamýšlené použití:

Sérologická diagnóza (IgG) aspergilózy.
Následná kontrola pacientů s rizikem aspergilózních infekcí.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) na mikrotitračních destičkách obsahujících následující směsi:

- Rozpustné somatické a metabolické antigeny *Aspergillus fumigatus*
- Rekombinantní antigeny: dipeptidylpeptidáza typ V (chymotrypsin) a ribonukleáza (mitogillin) z *Aspergillus fumigatus*

Přítomnost konkrétních mykotických protilátek v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Citlivé destičky se dodávají ve formě oddělitelných proužků pro ekonomické analýzy malých sérií vzorků.

Materiály v sadě (96 analýz):

WELL	6100-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující antigeny <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	destiček
DILB	6100-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x)	50	ml
WASH	6100-03	Koncentrát vyplachovacího roztoku (10 x)	50	ml
ENZB	6100-04	Enzymatický tlumicí roztok	50	ml
STOP	6100-05	Zastavovací roztok (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negativní kontrolní sérum	200	μl
CONTROL -/+	6100-07	Slabě pozitivní sérum (s meznou hodnotou)	200	μl
CONTROL +	6100-08	Pozitivní kontrolní sérum	200	μl
CONJ	6100-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy	300	μl
SUBS	6100-10	Substrát fosfatázy	20	tablet
		Nádoba s více pipetami, 25 ml	1	kus
		Rámeček pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při 2 až 8 °C (přeprava za teploty okolního prostředí). Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a μ l). Baňky. Zkumavky pro ředění séra. Lepicí páska k zakrytí destiček během inkubace. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na 37 °C. Čtečka ELISA nastavená na 405 nm.

Příprava činidel před použitím:

Destičky ELISA: otevřete bok hliníkové tašky 6100-01 a vyjměte požadovaný počet destiček. Umístěte destičky citlivé na danou látku do držáků 8 destiček. V případě potřeby zaplňte prázdné pozice v držáku pomocí použitých destiček. Vložte držák do rámečku ve správném směru. Znovu uzavřete balíček s polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: **zřed'te koncentrát (10x) tlumicího roztoku na ředění 6100-02 v destilované vodě v poměru 1/10.**

Vyplachovací roztok: zřed'te koncentrát (10x) vyplachovacího roztoku 6100-03 v destilované vodě v poměru 1/10. Můžete také použít vlastní vyplachovací roztok. Vyhněte se tlumicím roztokům obsahujícím fosfáty, které mohou potlačit enzymatickou činnost alkalické fosfatázy.

Negativní, slabě pozitivní (s meznou hodnotou) a pozitivní **kontrolní sérum:** zřed'te 10 μ l kontrolního séra 6100-06 na -08 ve 190 μ l tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/20).

Testované sérum: zřed'te 10 μ l séra ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečné zředění 1/201).

Protein A – **konjugát** alkalické fosfatázy: zřed'te konjugát 6100-09, v tlumicím roztoku na ředění (konečné zředění 1/51).

Roztok substrátu: předehejte enzymatický tlumicí roztok 6100-04 na teplotu okolí. Před přidáním substrátu na destičky ELISA rozpust'te tablety substrátu fosfatázy 6100-10 v nezředěném tlumicím roztoku 6100-04 (1 tableta v 2,5 ml tlumicího roztoku). Míchejte až do úplného rozpuštění tablet.

Zastavovací roztok: použijte neředěné činidlo 6100-05.



Varování a bezpečnostní opatření: Roztoky 6100-02, 6100-03, 6100-04 a 6100-09 obsahují 0,1 %, 0,05 %, 0,01 % a 0,1 % azidu sodného (N_3Na). Roztok 6100-02 obsahuje 0,02 % merthiolátu. Tyto látky jsou toxické. Zastavovací roztok 6100-05 (0,5 M K_3PO_4) je dráždivý.

Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (6100-06 až -08) pochází z králíků.

Připravované objemy:

			Celkový počet použitých destiček			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tlumicí roztok na ředění (10 x)	6100-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vyplachovací roztok (10 x)	6100-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugát	6100-09 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolní sérum	6100-06 až -08 + tlumicí roztok na ředění	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Testované sérum	Sérum + tlumicí roztok na ředění	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: Blokování:

Destičky zcela naplňte tlumicím roztokem pro ředění.

Nechte inkubovat po dobu 5 až 15 minut při okolní teplotě (blokování).

Vyjměte tlumicí roztok pro ředění odsátím nebo zaklepáním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 μ l samotného tlumicího roztoku pro ředění (bez séra, prázdný).

Naplňte následující tři destičky pomocí 100 μ l zředěného negativního, slabě pozitivního (s meznou hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (100 μ l do každé).

Naplňte zbývající destičky rozpuštěným testovaným sérem (100 μ l každá).

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte sérum a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Distribuuje 100 μ l rozpuštěného proteinu A – konjugát alkalické fosfatázy do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Vyjměte konjugát a 4x omyjte vyplachovacím roztokem.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Distribuuje 100 μ l roztoku substrátu do každé destičky.

Zakryjte destičky lepicí páskou a nechte inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C.

Zastavte reakci přidáním 100 μ l zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Otřete spodní části destiček, odstraňte bubliny a změřte absorbance při vlnové délce 405 nm.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček bez séra ze všech měřených hodnot. Test je platný, pokud jsou splněna následující kritéria: absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200, A negativního kontrolního vzorku < 10% A pozitivního kontrolního vzorku, A prázdného vzorku proti vzduchu < 0,350.

Koncentrace protilátek slabého pozitivního séra 6100-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů aspergilózy u imunokompetentních pacientů a sérem zdravých lidí.

Index hraniční hodnoty vzorku je definován po odečtení prázdného vzorku bez séra jako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance vzorku}}{\text{Absorbance séra s meznou hodnotou}}$$

Výsledek je **negativní**, když je index analyzovaného vzorku nižší než **1,0**. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenům **Aspergillus fumigatus** klinicky nevýznamná.

Šedá oblast odpovídá indexu v rozsahu od **0,8** do **1,0**. V tomto případě je vzorek považován za hraniční, doporučujeme opakovat test se stejným vzorkem nebo novým sérem stejného pacienta, odebraným po 2–4 týdnech.

Výsledek je **pozitivní**, když je index analyzovaného vzorku vyšší než 1. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenům **Aspergillus fumigatus** považována za klinicky významnou. Výsledek vede k aspergilóze nebo citlivosti na aspergilózu.

V každém případě je výsledky nutno korelovat s radioklinickým pozorováním na pacientovi.

V případě pacientů s potlačenou imunitou doporučujeme kompletní test s detekcí antigenů *A. fumigatus* v séru.

Tento kvantitativní a reprodukovatelný test umožňuje následnou kontrolu sérologické evoluce u uvedených pacientů.

Citlivost a specifita analýzy:

Citlivost 97 % byla zjištěna u 32 sér od 19 pacientů trpících různými formami aspergilózy (11 chronická nekrotizující aspergilóza, 12 aspergilloma, 2 aspergillus sinusitis a 7 alergická bronchopulmonální aspergilóza). Citlivost 22 % byla zjištěna u 9 sér od 5 pacientů trpících invazivní aspergilózou.

Specifita 98 % byla zjištěna u 131 sér od 67 pacientů trpících respiračními onemocněními nesouvisejícími s aspergilózou (kandidóza, tuberkulóza, pneumocystóza, kryptokokóza, virální nebo bakteriální pneumonie.)

Opakovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 24 destičkách v 1 analýze.

Reprodukovatelnost byla hodnocena testováním 2 vzorků lidského séra na 10 různých analýzách.

	Opakovatelnost		Reprodukovatelnost	
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 1	Vzorek 2
Průměr (hodnota OD)	0,352	1,767	0,410	1,985
Standardní odchylka (hodnota OD)	0,027	0,069	0,038	0,096
Koeficient odchylky (%)	7,6	3,9	9,3	4,8

Reference:

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.
Telefon: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

