

# Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Enzýmový imunotest na diagnózu ľudskej aspergilózy spôsobenej druhom *Aspergillus fumigatus*

96 testov v individuálnych diagnostických testovacích jamkách a na profesionálne laboratórne použitie



Návod na použitie pre artikel č. 6100  
Reg. zn. CE: CH-201301-0006 - UDI-DI: 07640158216101



## Plánované použitie:

Súprava Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA je určená na kvantitatívnu detekciu IgG protilátok proti *Aspergillus fumigatus* v ľudskom sére. Serológia je pomôcka pre diagnostiku a nemôže byť použitá ako jediný spôsob diagnostiky. Tento test je určený aj na sledovanie pacientov s rizikom infekcie aspergilózou.

## Pozadie:

Pľúcna aspergilóza je spôsobená rôznymi patogénnymi druhmi hubových rodov *Aspergillus*, pričom najčastejšie sa jedná o *Aspergillus fumigatus*. Tento patogén sa nachádza v pôde a rozkladajúcej sa organickej hmote. Ľudia vdychujú stovky spór denne, ale len ľudia s rizikovými faktormi rozvinú rôzne typy aspergilózy: alergickú bronchopulmonálnu aspergilózu, alergickú sinusitídu, aspergilóm a chronickú aspergilózu pľúc. Hlavnými príznakmi sú kašeľ a dýchavica. Keďže tieto symptómy sú nešpecifické, diagnóza je založená na kombinácii klinických, rádiologických, biologických a mykologických kritérií. Serológia je dôležitým kritériom a niekoľko metód je k dispozícii na skrining, sledovanie a potvrdenie.

## Princíp a prezentácia:

V súprave sa nachádza všetok materiál potrebný na vykonanie 96 testov ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) na rozbitných 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*

Špecifické protilátky vo vzorke sa viažu na tieto antigény a premytie odstráni nešpecifické protilátky. Prítomnosť séra protilátok špecifických pre plesňové je detekovaná proteínom A - konjugátom alkalickéj fosfatázy. Druhý premývací krok odstráni nenaviazaný konjugát. Odhalenie naviazaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalickéj fosfatázy zožltne. Intenzita farby je úmerná množstvu špecifických protilátok proti *Aspergillus fumigatus* vo vzorke. K zastaveniu reakcie sa pridá fosforečnan draselný. Absorbancia pri 405 nm sa odčíta pomocou snímača mikrodoštičiek ELISA.

Test sa môže vykonať s automatickými systémami, ale musí byť overený používateľom.

## Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

<b>WELL</b>	6100-01	Odlúčiteľné ELISA prúžky senzitivované antigénmi <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	jamky
<b>DILB</b>	6100-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	50	ml
<b>WASH</b>	6100-03	Koncentrát premývacieho roztoku (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	6100-04	Enzýmový tlmivý roztok	50	ml
<b>STOP</b>	6100-05	Zastavovací roztok (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	6100-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	6100-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
<b>CONTROL</b> +	6100-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
<b>CONJ</b>	6100-09	Proteín A - konjugát alkalickéj fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
<b>SUBS</b>	6100-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		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), zabráňte dlhodobému vystaveniu komponentov priamemu svetlu. Dátum expirácie a číslo šarže sady sú uvedené na boku škatule. Po počiatočnom otvorení sú všetky reagenty stabilné až do dátumu spotreby, keď sú skladované pri 2-8°C.

### Potrebné vybavenie, ktoré nie je dodané spolu so sadou:

Pipety (ml and µl). Banky. Riediace skúmavky. Lepiaca páska na zakrytie jamiek v priebehu inkubácie. Destilovaná voda. Inkubátor nastavený na teplotu 37°C. Prístroj ELISA nastavený na 405 nm. Manuálne alebo automatické zariadenia na oplachovanie jamiek. Vortex mixér. Časovač.

### Príprava reagentov pred použitím:

Všetky reagenty dostaňte na izbovú teplotu a pred použitím ich premiešajte.

**Jamky ELISA:** otvorte hliníkovú tašku 6100-01 po strane a vyberte potrebný počet jamiek (jedna vzorka bez séra, tri pre kontroly plus počet vzoriek). 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 vysušacieho vankúšika.

**Tlmivý riediaci roztok:** rozriedte koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x) 6100-02, v destilovanej vode v pomere 1/10. Toto sa používa na riedenie kontrol, vzoriek a konjugátu. Tlmivý riediaci roztok je stabilný 2 mesiace pri 2-8 °C.

**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 alkalické fosfatázy. Zriedený premývací roztok je stabilný 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Kontrolné séra:** rozriedte 10 µl kontrolných sér 6100-06 až -08 v 190 µl tlmivého roztoku (finálne zriedenie 1/20). Zriedené kontrolné séra sú stabilné 2 mesiace pri teplote 2-8°C.

**Konjugát:** rozriedte konjugát 6100-09 v tlmivom roztoku (finálne zriedenie 1/50). Zriedte konjugát v deň testu. Neuchovávajte zriedený konjugát.

**Roztok substrátu:** rozpustite tablety substrátu fosfatázy 6100-10 v neriedenom enzýmovom tlmivom roztoku 6100-04 (1 tableta v 2,5 ml roztoku). Miešajte pokým sa tableta úplne nerozpustí. Rozriedte substrát v deň testu a chráňte skúmavku pred priamym svetlom. Tablety a roztoky substrátu by mali byť bezfarebné alebo by mali mať iba slabý žltý nádych. Ak sa tableta alebo roztok substrátu zmení na žltú, mohli sa čiastočne hydrolyzovať a musia sa zlikvidovať. Tlmivý riediaci roztok substrátu Neskladujte.

**Zastavovací roztok:** použite reagent 6100-05, nezriedený.

### Odber a príprava vzoriek:

Použite ľudské sérum. Sérum sa musí skladovať pri teplote 2-8°C, ak sa analyzuje v priebehu niekoľkých dní, inak sa skladuje pri teplote -20°C alebo menej. Vyhnite sa opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu. Vzorky vortexujte a zriedte 1/201 v roztoku zriedovacieho tlmivého roztoku (napríklad 5 µl vzorky v 1,0 ml).

### Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN <sub>3</sub> )	Merthiolát
Tlmivý riediaci roztok (10 x)	6100-02	0,1%	0,02%
Premývací roztok (10 x)	6100-03	0,05%	/
Premývací roztok	6100-04	0,01%	/
Kontrolné séra (20 x)	6100-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	6100-09	0,1%	/

Pri použitých koncentráciách nemá azid sodný a merthiolát pri styku s kožou a sliznicami žiadne toxikologické riziko.

- Zastavovací roztok 6100-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dráždivý.
- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (6100-06 až -08) sú z králikov.
- Zaochádzajte so všetkými reagentmi a vzorkami ako s potenciálne infekčnými látkami.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov so súpravami Bordier ELISA.
- Nepoužívajte reagenty od iných výrobcov s reagentmi tejto súpravy.
- Nepoužívajte reagenty po dátume spotreby.
- Bezprostredne po použití ihneď zatvorte liekovky s reagentmi a nevymieňajte skrutkové uzávery, aby ste zabránili kontaminácii.
- Pre každú vzorku použite oddelené a čisté špičky pipiet.
- Jamky nepoužívajte opakovane.
- Zabráňte znehodnoteniu mikrojamek mechanickým pôsobením (špičky/kužele, dýzy).
- Popisy symbolov použitých na etiketách nájdete na webovej stránke [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Pokyny pre likvidáciu:

Všetky materiály použité na tento test sa vo všeobecnosti považujú za nebezpečný odpad. Pozrite si národné a regionálne zákony a nariadenia na likvidáciu nebezpečného odpadu.

## Postup:

Pri vykonávaní testu zabráňte tvorbe bublín v jamkách.

### 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 (vzorky bez séra).

Naplňte nasledujúce tri jamky v danom poradí 100 µl zriedeného negatívneho, slabého pozitívneho (s medznou hodnotou) a pozitívneho kontrolného séra. Pri testoch s viac ako 25 vzorkami odporúčame vyplniť tri posledné jamky s kontrolnými sérami ako duplikát.

Naplňte ostávajúce jamky zriedenými vzorkami (100 µl každá).

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite s približne 250 µl premývacieho roztoku.

### Krok 3: Inkubácia s konjugátom:

Rozdeľte 100 µl zriedeného konjugátu do každej jamky (vrátane vzorky bez séra).

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

Odstráňte séra a 4 x opláchnite 250 µl premývacieho roztoku.

### 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 absorbcie:

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbciu pri 405 nm do 1 hodiny po pridaní zastavovacieho roztoku.

## Vyhodnotenie:

Odpočítajte hodnotu vzorky bez séra od všetkých meraných hodnôt. Ak je to vhodné, vypočítajte priemerné hodnoty absorpcie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorpcia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1,200
- A slabšej pozitívnej kontrolnej vzorky > 11% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A negatívnej kontrolnej vzorky < 8% A pozitívnej kontrolnej vzorky
- A vzorky bez séra < 0.350

Kontroly kvality súčasných častí sú uverejnené na našej webovej stránke: [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

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

Index medznej hodnoty vzorky je definovaný, po odpočítaní vzorky bez séra, ako:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbčná vzorka}}{\text{Absorbcia séra s medznou hodnotou}}$$

Výsledok je **negatívny**, keď je index analyzovanej vzorky nižší ako **0,8**. 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 index analyzovanej vzorky vyšší ako **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 prípade pozitívneho alebo pochybného výsledku odporúčame vykonať potvrdzovací test (najčastejšie western blot), ak je takýto test dostupný alebo je vyžadovaný vnútroštátnymi predpismi.

## Analytické výkony:

### Analytická špecifickosť:

Citlivosť 22 % sa zistila v 9 sérach 5 pacientov trpiacich invazívnou aspergilózou. V prípade imunosuprimovaných pacientov sa odporúča doplniť test o detekciu antigénov *A. fumigatus* v sére. Presnosť s výškou 97 % sa zistila v 36 sérach 24 pacientov trpiacich neaspergilovými respiračnými ochoreniami (kandidóza, tuberkulóza, pneumocystóza a kryptokokóza).

Pri suprafyziologických koncentráciách hemoglobínu, lipidov alebo bilirubínu v sérach doplnených interferentmi sa nepozorovala žiadna pozitívna ani negatívna interferencia.

### Precíznosť:

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
<b>Priemer (absorbancia)</b>	0,352	1,767	0,410	1,985
<b>Štandardná odchýlka (absorbancia)</b>	0,027	0,069	0,038	0,096
<b>Variačný koeficient (%)</b>	7,6	3,9	9,3	4,8

Tieto výkony nemožno hodnotiť, pretože pre túto analýzu neexistuje certifikovaný referenčný materiál:

- analytická citlivosť (limity detekcie a kvantifikácie),
- presnosť,
- pravdivosť,
- rozsah merania,
- linearita.

## Klinické výkony:

### Diagnostická citlivosť:

Citlivosť 97 % sa zistila v 230 sérach 147 pacientov trpiacich rôznymi aspergilózami (104 chronická pľúcna aspergilóza (vrátane 17 aspergilómom a 43 alergická bronchopulmonálna aspergilóza).

### Diagnostická špecifickosť:

Presnosť s výškou 90 % sa zistila v 206 sérach 205 pacientov s respiračnými symptómami, u ktorých bola vylúčená choroba súvisiaca s *Aspergillus*.

### Pozitívna a negatívna prediktívna hodnota:

Pri vyššie uvedených populáciách sa zistila PPV 92% a NPV 96%.

### Očakávané hodnoty u normálnej a postihnutej populácie:

V normálnej populácii 99 švajčiarskych darcov krvi, 98 sér zo švajčiarskeho infekčného oddelenia a 90 sér pacientov s podozrením na aspergilózu, u ktorých však bolo toto ochorenie s určitou vylúčené, je očakávaná hodnota indexu 0,16. V postihnutej populácii 63 sér pacientov trpiacich rôznymi aspergilózami je očakávaná hodnota indexu 2,16.

### Incidenty:

Každý vážny incident, ktorý sa vyskytne v súvislosti s pomôckou, sa oznámi výrobcovi a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom má používateľ alebo pacient sídlo.

### Obmedzenia:

Diagnóza infekčnej choroby by sa nemala stanoviť na základe jediného výsledku testu. Presná diagnóza by mala brať do úvahy endemickú situáciu, klinickú anamnézu, symptomatológiu, zobrazovanie ako aj sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientov a novorodencov majú sérologické údaje obmedzenú hodnotu.

### Odkazy na použitú literatúru:

**Barrera, C., Richaud-Thiriez, B., Rocchi, S., Rognon, B., Roussel, S., Grenouillet, F., Laboissière, A., Dalphin, J.C., Reboux, G. and Millon, L.** (2016) New commercially available IgG kits and time-resolved fluorometric IgE assay for diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Clin Vaccine Immunol* **23**, 196–203.

**Dumollard, C., Bailly, S., Perriot, S., Brenier-Pinchart, M.P., Saint-Raymond, C., Camara, B., Gangneux, J.P., Persat, F., Valot, S., Grenouillet, F., Pelloux, H., Pinel, C., Cornet, M. and Grenoble *Aspergillus* Committee.** (2016) Prospective evaluation of a new *Aspergillus* IgG enzyme immunoassay kit for diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* **54**, 1236–1242.

**Wilopo, B., A., P., Hunter, E., S., Richardson, M., D. and Denning, D., W.** (2020) Optimising the cut-off of the Bordier *Aspergillus* IgG ELISA for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *J. Microbiol. Methods* **176**.



**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](http://www.bordier.ch)

