

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
UDI-DI: 07640158216101



Plánované použitie:

Súprava Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA je určená na kvalitatívnu 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:

Plúcna 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 skríning, 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 senzitizedovaných 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 alkalické fosfatázy. Druhý premývavý krok odstráni nenaviazaný konjugát. Odhalenie naviazaných protilátok sa uskutočňuje pridaním substrátu pNPP, ktorý v prítomnosti alkalické 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 je manuálny, ale je možné vykonať s automatickými systémami, ktoré musí byť overený používateľom.

Materiál obsiahnutý v sade (96 testovacích jamiek):

WELL	6100-01	Odlúčiteľné ELISA pružky senzitizedované antigénmi <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	jamky
DILB	6100-02	Koncentrát tlmivého riediaceho roztoku (10 x), fialová farba	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 (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negatívne kontrolné sérum (20 x), zelený uzáver	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Slabé pozitívne kontrolné sérum (s medznou hodnotou, 20 x), žltý uzáver	200	µl
CONTROL +	6100-08	Pozitívne kontrolné sérum (20 x), červený uzáver	200	µl
CONJ	6100-09	Proteín A - konjugát alkalické fosfatázy (50 x), fialový uzáver	300	µl
SUBS	6100-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tabliet
		Zásobník na pipety, 25 ml	1	Kus
		Podstavec na 8-jamkový držiak ELISA	1	Kus

Trvanlivosť a uskladnenie:

Uložte súpravu medzi +2°C až +8°C (transport validovaný medzi -20°C a +37°C počas 21 dní), 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 teplote +2°C až +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 reaktanty medzi +20°C až +30°C po dobu najmenej 1 hodiny a pred použitím 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 senzitivované 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 teplote +2°C až +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°C až +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°C až +8°C.

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

Roztok substrátu: rozpustíte 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. Uložte medzi +2°C až +8°C, ak je analyzovaná do 7 dní, inak sa skladujte 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). Zriedenú vzorku neskladujte.

Upozornenie a prevencia:

Toxické zlúčeniny sa nachádzajú v nasledujúcej koncentrácii:

Zložka	Referencia	Azid sodný (NaN ₃)	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.

Zložka	Nebezpečná zložka	Nebezpečná zložka	Vyhlásenie o nebezpečenstve	Preventívne vyhlásenie
Zastavovací roztok	fosforečnan draselný trojzložkový		Spôsobuje vážne poškodenie očí	Noste ochranné okuliare. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Opatrne niekoľko minút oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

- Negatívne, slabé pozitívne a pozitívne kontrolné séra (6100-06 až -08) sú živočíšneho pôvodu (králiky) a musí sa s nimi zaobchádzať opatrne.
- Zaobchádzajte 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 reagentami 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.

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: Predinkubácia:

Naplňte jamky 250 µl tlmivým roztokom.

Inkubujte po dobu 5 až 15 minút pri teplote +20°C až +30°C.

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 absorbancie:

V prípade potreby utrite dná jamiek a odstráňte bubliny. Merajte absorbanciu 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 absorbancie duplikovaných sérových kontrol. Test je platný pokiaľ sú splnené nasledovné kritériá:

- absorbancia (A) pozitívnej kontrolnej vzorky > 1,200
- A slabej 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.

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 väčší 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:

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 v duplikáte 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	0,102
Variačný koeficient (%)	7,6	3,9	9,2	5,1

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:

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.

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.

Yamagishi, I., Bamba, Y., Moro, H., Kanno, N., Tsuruma, H. Hakamata, M. et al. (2024) Retrospective Comparison of Two Aspergillus IgG Enzyme Immunoassays for Diagnosing Pulmonary Aspergillosis. Med. Mycol. J. 65 : 41-47.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.

+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

