

Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Imunološko određivanje enzimima za dijagnozu ljudske aspergiloze pomoću *Aspergillus fumigatus*

96 testova na pojedinačnim jažicama za in vitro dijagnostičku upotrebu i za profesionalnu laboratorijsku upotrebu



Upute za upotrebu za br. artikla **6100**
UDI-DI: 07640158216101



Predviđena upotreba:

Komplet Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA namijenjen je za kvalitativno prepoznavanje antitijela protiv *Aspergillus fumigatus* u ljudskom serumu. Serologija je pomoć pri dijagnostici i ne može se upotrebljavati kao jedina dijagnostička metoda. Ovaj test namijenjen je i naknadnim pretragama pacijenata s rizikom od infekcija aspergiloze.

Pozadina:

Plućnu aspergilozu uzrokuju različite patogene vrste roda gljiva *Aspergillus*, a najčešće implicirani jest *Aspergillus fumigatus*. Ovaj se patogen nalazi u tlu i raspadajućim organskim tvarima. Ljudi dnevno udišu stotine spora, no samo će osobe s rizičnim čimbenicima razviti različite vrste aspergiloze: alergijsku bronhopulmonalnu aspergilozu, alergijski sinusitis, aspergilom i kroničnu plućnu aspergilozu. Glavni su simptomi kašalj i otežano disanje. Budući da ti simptomi nisu specifični, dijagnoza se temelji na kombinaciji kliničkih, radioloških, bioloških i mikoloških kriterija. Serologija je važan kriterij, a za pregled, naknadne pretrage i potvrdu dostupne su razne metode.

Načelo i prezentacija:

Komplet osigurava sve potrebne materijale za provedbu 96 imunoenzimskih testova povezanih s enzimima (ELISA) na lomljivim jažicama mikrotitracijske pločice senzibiliziranih sljedeća mješavina:

- topljivi somatski i metabolički antigeni vrste *Aspergillus fumigatus*.
- rekombinantni antigeni: dipeptid peptidaza tipa V (kimotripsin) i ribonukleaza (mitogilin) vrste *Aspergillus fumigatus*.

Specifična antitijela u uzorku povezat će se s tim antigenima, a ispiranjem će se ukloniti nespecifična antitijela. Prisutnost gljivičnih specifičnih antitijela prepoznaje se s konjugatom alkalne fosfataze proteina A. Drugim korakom ispiranja uklonit će se nevezani konjugat. Otkrivanje vezanih antitijela provodi se dodavanjem supstrata pNPP-a koji poprima žutu boju kada je prisutna alkalna fosfataza. Jačina boje proporcionalna je količini antitijela specifičnih za parazit *Aspergillus fumigatus* u uzorku. Za zaustavljanje reakcije dodaje se kalijev fosfat. Apsorpcija pri 405 nm očitava se upotrebom čitača mikrotitrirajućih pločica ELISA.

Test je ručni, ali se može provesti automatskim sustavima, koje korisnik mora potvrditi.

Materijal sadržan u kompletu (96 testova):

WELL	6100-01	Lomljive trake ELISA senzibilizirane as <i>Aspergillus fumigatus</i> antigeni	96	jažica
DILB	6100-02	Koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x), obojen ljubičasto	50	ml
WASH	6100-03	Koncentrat otopine za ispiranje (10 x)	50	ml
ENZB	6100-04	Enzimski pufer	50	ml
STOP	6100-05	Otopina za zaustavljanje (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni čep	200	μl
CONTROL -/+	6100-07	Slab pozitivni kontrolni serum (prekinut, 20 x), žuti čep	200	μl
CONTROL +	6100-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), crveni čep	200	μl
CONJ	6100-09	Protein A - konjugat alkalne fosfataze (50 x), ljubičasti čep	300	μl
SUBS	6100-10	Supstrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tableta
		Spremnik s više pipeta, 25 ml	1	komad
		Okvir za držač za 8 jažica ELISA	1	komad

Vijek trajanja i čuvanje:

Čuvajte komplet između +2°C i +8°C (transport potvrđen između -20°C i +37°C tijekom 21 dana), izbjegavajte dulje izlaganje komponenti izravnu svjetlu. Datum isteka roka valjanosti i broj serije kompleta otisnuti su na bočnoj strani kutije. Reagensi su nakon prvog otvaranja stabilni do datuma isteka roka valjanosti ako se čuvaju na temperaturi između +2°C i +8°C.

Potrebna oprema koja nije isporučena uz komplet:

Pipete (ml i μl). Tikvice. Cijevi za razrjeđivanje. Ljepljiva traka za prekrivanje jažica tijekom inkubacija. Destilirana voda. Inkubator postavljen na +37°C. Komplet čitača ELISA postavljen na 405 nm. Ručna ili automatska oprema za ispiranje jažica. Vrtložna miješalica. Brojač vremena.

Priprema reagensa prije upotrebe:

Sve reagense ostavite na temperaturi između +20°C i +30°C najmanje 1 sat i promiješajte prije upotrebe.

Jažice ELISA: otvorite bočni dio aluminijske vrećice 6100-01 i izvadite onoliko jažica koliko je potrebno (jedna za prazan položaj, tri za kontrole plus za broj uzoraka). Postavite dezinficirane jažice u držač(e) za 8 jažica. Ako je potrebno, popunite prazne položaje u držaču rabljenim jažicama. Umetnite držač(e) u okvir u ispravnom smjeru. Ponovno zatvorite otvoreno pakiranje i umetnite jastučić za odvlaživanje.

Pufer za razrjeđivanje: razrijedite koncentrat pufera za razrjeđivanje (10 x) 6100-02 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Upotrebljava se za razrjeđivanje kontrola, uzoraka i konjugata. Razrijeđeni pufer stabilan je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Otopina za ispiranje: razrijedite koncentrat otopine za ispiranje (10 x) 6100-03 u omjeru od 1 : 10 u destiliranoj vodi. Možete se koristiti i vlastitom otopinom za ispiranje. Izbjegavajte upotrebu pufera koji sadrže fosfat jer bi se njima mogla spriječiti enzimatska aktivnost alkalne fosfataze. Razrijeđena otopina za ispiranje stabilna je tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Kontrolni serumi: razrijedite 10 µl kontrolnih seruma 6100-06 do -08 u 190 µl otopine pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 20). Razrijeđeni kontrolni serumi stabilni su tijekom razdoblja od 2 mjeseca na temperaturi između +2°C i +8°C.

Konjugat: razrijedite konjugat 6100-09 u otopini pufera za razrjeđivanje (konačno razrjeđivanje u omjeru od 1 : 50). Razrijedite konjugat na dan provedbe testa. Nemojte čuvati već razrijeđeni konjugat.

Otopina supstrata: otopite tabletu (ili tablete) supstrata fosfataze 6100-10 u nerazrijeđenom enzimskom puferu 6100-04 (1 tableta u 2,5 ml pufera). Miješajte u vrtložnoj miješalici do potpunog otapanja tablete (ili tableta). Razrijedite supstrat na dan provedbe testa i zaštitite cijev od izravna svjetla. Tablete i otopine supstrata morale bi biti bezbojne ili imati tek žućkastu nijansu. Ako tableta ili otopina supstrata poprimi žutu boju, možda je djelomično hidrolizirana i mora se zbrinuti u otpad. Nemojte čuvati otopinu supstrata.

Otopina za zaustavljanje: upotrijebite nerazrijeđeni reagens 6100-05.

Prikupljanje i priprema uzoraka:

Upotrebljavajte ljudski serum. Serum treba čuvati na temperaturi između +2°C i +8°C ako se test izvede unutar 7 dana, a u protivnom na temperaturi od -20°C ili nižoj. Izbjegavajte opetovano zamrzavanje i odmrzavanje.

Miješajte uzorke u vrtložnoj miješalici i razrijedite ih u omjeru od 1 : 201 u otopini pufera za razrjeđivanje (na primjer, uzorak od 5 µl u 1,0 ml). Nemojte čuvati razrijeđeni uzorak.

Upozorenja i mjere predostrožnosti:

Toksični spojevi postoje u sljedećoj koncentraciji:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (NaN_3)	Mertiolat
Pufer za razrjeđivanje (10 x)	6100-02	0,1%	0,02%
Otopina za ispiranje (10 x)	6100-03	0,05%	/
Enzimski pufer	6100-04	0,01%	/
Kontrolni serumi (20 x)	6100-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	6100-09	0,1%	/

U pogledu rabljenih koncentracija, natrijev azid i mertiolat ne predstavljaju toksikološki rizik pri dodiru s kožom i sluznicama.

Komponenta	Opasna komponenta	Opasnosti piktogram	Oznaka opasnosti	Izjava o mjerama opreza
Otopina za zaustavljanje	kalijev fosfat, trobazni		Uzrokuje teške ozljede oka	Nositi zaštitu za oči. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: Oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje.

- Negativni, slabo pozitivni i pozitivni kontrolni serumi (6100-06 do -08) su životinjskog podrijetla (kunići) i s njima se mora pažljivo rukovati.
- Postupajte sa svim reagensima i uzorcima kao s potencijalno infektivnim materijalom.
- Nemojte međusobno zamjenjivati reagense različite broj serije ni kompleta Bordier ELISA.
- Nemojte upotrebljavati reagense drugih proizvođača s reagensima iz ovog kompleta.
- Nemojte upotrebljavati reagense nakon isteka roka valjanosti.
- Čvrsto zatvorite bočice s reagensom neposredno nakon upotrebe i nemojte međusobno zamjenjivati čepove kako biste izbjegli kontaminaciju.
- Koristite se zasebnim i čistim vrhovima pipeta za svaki uzorak.
- Nemojte ponovno upotrebljavati mikrojažice.

- Spriječite propadanje mikrojažica mehaničkim djelovanjem (vrhovi/stošci, štrcaljke).
- Opisi simbola rabljenih na oznakama mogu se pronaći na web-mjestu www.bordier.ch.

Upute o zbrinjavanju u otpad:

Svi materijali koji se upotrebljavaju za ovaj test načelno se smatraju opasnim otpadom. Poštujte nacionalne te lokalne zakone i propise za zbrinjavanje opasnog otpada.

Postupak:

Tijekom provedbe testa spriječite stvaranje mjehurića u jažicama.

1. Korak: Predinkubacija:

Napunite jažice s 250 µl otopine pufera za razrjeđivanje.

Inkubirajte 5 do 15 minuta između +20°C i +30°C.

Uklonite pufer za razrjeđivanje aspiracijom ili tako što ćete jažice protresti nad sudoperom.

2. korak: Inkubacija s uzorcima:

Napunite prvu jažicu prve trake samo upotrebom 100 µl pufera za razrjeđivanje (prazan položaj bez seruma).

Svaku od naknadnih triju jažica napunite upotrebom 100 µl razrijeđenog negativnog, slabo pozitivnog (prekinutog) i pozitivnog kontrolnog seruma. Za testove s više od 25 uzoraka, preporučujemo punjenje posljednjih triju jažica kontrolnim serumima kao duplikatom.

Napunite preostale jažice razrijeđenim uzorcima (svaku sa 100 µl).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite serume i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

3. korak: Inkubacija s konjugatom:

Raspodijelite 100 µl razrijeđenog konjugata u svaku jažicu (uključujući prazan položaj bez seruma).

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Uklonite konjugat i isperite 4 puta upotrebom ~ 250 µl otopine za ispiranje.

4. korak: Inkubacija sa supstratom:

Raspodijelite 100 µl otopine supstrata u svaku jažicu.

Prekrijte jažice ljepljivom trakom i inkubirajte 30 minuta na +37°C.

Zaustavite reakciju dodavanjem 100 µl otopine za zaustavljanje u svaku jažicu.

5. korak: Mjerenje apsorpcija:

Ako je potrebno, prebrišite dno jažica i uklonite mjehuriće. Mjerite apsorpcije pri 405 nm unutar sat vremena nakon dodavanja otopine za zaustavljanje.

Tumačenje:

Oduzmite vrijednost prazan položaj bez seruma od svih izmjerenih vrijednosti. Ako je primjenjivo, izračunajte srednje vrijednosti apsorpcije dupliciranih serumskih kontrola. Test je valjan ako su ispunjeni sljedeći preduvjeti:

- apsorpcija (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A slabe pozitivne kontrole > 11% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole > 8% A pozitivne kontrole
- A prazan položaj bez seruma < 0,350.

U slučaju da uzorak daje signal koji prelazi raspon mjerenja čitača mikropločice, treba dodijeliti vrijednost koja odgovara gornjem rasponu mjerenja čitača.

Kontrole kvalitete trenutačnih serija objavljene su na našem web-mjestu www.bordier.ch.

Koncentracija antitijela u slabo pozitivnom (prekinutom) serumu 6100-07 postavljena je za optimalno razlikovanje između seruma klinički dokumentiranih slučajeva aspergiloze od imunokompetentnih pacijenata i zdravih ljudskih seruma. Indeks prekida uzorka definira se, nakon oduzimanja prazan položaj bez seruma, kao:

$$\text{indeks} = \frac{\text{apsorbirani uzorak}}{\text{apsorbirani prekinuti serum}}$$

Rezultat je **negativan** kada je indeks analiziranog uzorka niži od **0,8**. U ovom je slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Aspergillus fumigatus* klinički beznačajna.

Sivo područje odgovara indeksu koji se nalazu u rasponu između **0,8** i **1,0**. U ovom se slučaju, uzorak smatra graničnim, preporučuje se ponoviti testiranje istim uzorkom ili novim serumom istog bolesnika uzetim nakon 2 do 4 tjedna. Rezultat je **pozitivan** kada je indeks analiziranog uzorka viši od **1,0**. U ovom se slučaju, koncentracija antitijela IgG protiv antigena *Aspergillus fumigatus* smatra klinički značajnom. Ovaj rezultat dovodi do aspergiloze ili senzibilizacije na aspergilus.

U slučaju sumnjiva rezultata, preporučujemo provedbu testa u svrhu potvrđivanja (najčešće testom Western blot) ako je takav test dostupan ili ako je propisan nacionalnim odredbama.

Analitički rezultati:

Analitička specifičnost:

Specifičnost od 97% pronađena je u 36 seruma od 24 bolesnika koji boluju od bolesti dišnih putova koji nisu aspergilni (kandidijaza, tuberkuloza, pneumocistoza i kriptokokoza).

Ni pozitivna ni negativna interferencija nije zapažena za suprafiziološke koncentracije hemoglobina, lipida ili bilirubina u serumima dopunjenim interferentima.

Preciznost:

Ponovljivost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma u 24 jažice na 1 testu.

Reproducibilnost je bila procijenjena testiranjem 2 uzorka ljudskih seruma duplikatu u 10 različitim testova.

	Ponovljivost		Reproducibilnost	
	1. uzorak	2. uzorak	1. uzorak	2. uzorak
Prosjeak (apsorpcija)	0,352	1,767	0,410	1,985
Standardno odstupanje (apsorpcija)	0,027	0,069	0,038	0,102
Koeficijent varijacije (%)	7,6	3,9	9,2	5,1

Klinički rezultati:

Dijagnostička osjetljivost:

Osjetljivost od 97% pronađena je u 230 seruma od 147 bolesnika koji boluju od raznih oblika aspergiloze (104 od kronične plućne aspergiloze (uključujući 17 aspergiloma) i 43 od alergijske bronhopulmonalne aspergiloze).

Dijagnostička specifičnost:

Specifičnost od 90% pronađena je u 206 seruma od 205 bolesnika s respiratornim simptomima kod kojih je isključena mogućnost bolesti povezane s vrstom *Aspergillus*.

Pozitivna i negativna predvidljiva vrijednost:

PPV od 92% i NPV od 96% pronađene su u spomenutim populacijama.

Očekivane vrijednosti u normalnim i pogođenim populacijama:

U normalnoj populaciji od 99 švicarskih darivatelja krvi, 98 seruma iz švicarske infektološke jedinice i 90 seruma od bolesnika kod kojih se sumnja na aspergilozu, no kod kojih je postojanje ove bolesti sa sigurnošću isključeno, očekivana indeksna vrijednost iznosi 0,16. U pogođenoj populaciji od 63 seruma od bolesnika koji boluju od raznih oblika aspergiloze očekivana indeksna vrijednost iznosi 2,16.

Incidenti:

Svaki ozbiljan incident koji nastupi u vezi s proizvodom mora se prijaviti proizvođaču i nadležnom tijelu države članice u kojoj korisnik i/ili bolesnik ima prebivalište.

Ograničenja:

Osjetljivost od 22% pronađena je u 9 seruma od 5 bolesnika koji boluju od invazivne aspergiloze. U slučaju imunosuprimiranih bolesnika preporučuje se dovršiti testiranje otkrivanjem antigena vrste *A. fumigatus* u serumu.

Dijagnoza zarazne bolesti ne smije se postaviti na temelju rezultata jednog testa. Precizna dijagnoza u obzir mora uzeti endemsku situaciju, kliničku povijest, simptomatologiju, podatke snimki te serološke podatke.

U imunokompromitiranih pacijenata i novorođenčadi serološki su podatci ograničene valjanosti.

Reference:

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

