

Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Enzymatický imunologický test pro diagnózu lidské aspergilózy od *Aspergillus fumigatus*

96 testovacích vzorků v individuálním balení pro diagnostické použití in vitro a k profesionálnímu laboratornímu použití



Návod k použití pro produkt č. 6100
EC reg. č.: CH-201301-0006 - UDI-DI: 07640158216101



Předpokládané použití:

Sada *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA od společnosti Bordier je určena ke kvantitativní detekci protilátek IgG proti *Aspergillus fumigatus* v lidském séru. Sérologie je pomůckou k diagnóze a nesmí být používána jako jediná metoda diagnózy. Tento test je rovněž určen k průběžnému testování pacientů s rizikem nákazy aspergilózou.

Pozadí:

Plicní aspergilóza je způsobena různými patogenními druhy houby rodu *Aspergillus*, nejčastěji se jedná o druh *Aspergillus fumigatus*. Tento patogen je v zemině a jeho úkolem je rozkládat organickou hmotu. Lidé inhalují denně stovky jejích spor, různé typy aspergilózy se však vyvinou pouze u lidí s rizikovými faktory: alergická bronchopulmonální aspergilóza, alergická sinusitida, aspergilom a chronická plicní aspergilóza. Hlavním symptomem je dýchavičnost. Protože jsou tyto symptomy nespecifické, diagnóza se opírá o klinická, radiologická, biologická a mykologická kritéria. Sérologie je důležitým kritériem a k dispozici jsou také některé metody screeningu, průběžného sledování a stanovení přítomnosti mikrobů.

Princip a prezentace:

Sada obsahuje veškerý materiál nutný k provedení 96 enzymových imunisorbentních analýz (ELISA) přerušovanou mikrotitrací na destičkách obsahujících následující směs:

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

Specifické protilátky ve vzorku se vážou na tyto antigeny a omytím se odstraní nespecifické protilátky. Přítomnost konkrétních mykotických protilátek v séru se zjišťuje pomocí konjugátu alkalické fosfatázy proteinu A. Druhý krok mývání odstraní nenavázaný konjugát. Navázané protilátky odhalíme přidáním substrátu pNPP, který se zbarví v přítomnosti alkalické fosfatázy dožluta. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství specifických protilátek proti *Aspergillus fumigatus* ve vzorku. K zastavení reakce se přidává dihydrogenfosforečnan draselný. Absorbance na vlnové délce 405 nm je z mikrodětičky odečtena prostřednictvím analyzátoru ELISA.

Test mohou provádět i automatické systémy, výsledky však musí být ověřeny uživatelem.

Materiály obsažené v sadě (96 testů):

WELL	6100-01	Oddělitelné proužky ELISA obsahující antigeny <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	destiček
DILB	6100-02	Koncentrát tlumicího roztoku na ředění (10 x), zbarven nachově	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 (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negativní kontrolní sérum (20 x), zelené víčko	200	μl
CONTROL -/+	6100-07	Slabě pozitivní kontrolní sérum (s mezní hodnotou, 20 x), žluté víčko	200	μl
CONTROL +	6100-08	Positivní kontrolní sérum (20 x), červené víčko	200	μl
CONJ	6100-09	Protein A – konjugát alkalické fosfatázy (50 x), nachové víčko	300	μl
SUBS	6100-10	Substrát fosfatázy (para-nitrofenylfosfát)	20	tablet
		Nádoba s několika pipetami, 25 ml	1	kus
		Stojan pro držák 8 destiček ELISA	1	kus

Datum spotřeby a skladování:

Sadu skladujte při teplotě 2 až 8°C (přeprava za teploty okolního prostředí), chraňte před dlouhodobým vystavením jejích součástí přímému světlu. Datum spotřeby a číslo šarže na sadě jsou vytištěny na boku krabice. Pokud jsou pak skladovány při teplotě 2-8°C, jsou po otevření originálního balení všechna činidla stabilní až do uvedeného data spotřeby.

Nezbytné vybavení, které není součástí sady:

Pipety (ml a µl). 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. Manuální nebo automatické zařízení pro oplachování destiček. Vířivý mixer. Časovač.

Příprava činidel před použitím:

Zahřejte všechna činidla na pokojovou teplotu a před použitím je protřepejte.

Destičky ELISA: Otevřete bok hliníkové tašky 6100-01 a vyjměte požadovaný počet destiček (jednu prázdnou, tři pro kontrolu plus počet vzorků). 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 a utěsněte jej polštářkem proti vlhkosti.

Tlumicí roztok na ředění: Zředte koncentrát (10 x) tlumicího roztoku na ředění 6100-02 v destilované vodě v poměru 1/10. To se používá k ředění kontrolních destiček, vzorků a konjugátu. Naředěný tlumicí roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Vyplachovací roztok: Zředte koncentrát (10 x) 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. Naředěný vyplachovací roztok je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Kontrolní sérum: Zředte 10 µl kontrolního séra 6100-06 až -08 ve 2,0 ml tlumicího roztoku na ředění (konečně zředění 1/201). Naředěné kontrolní sérum je stabilní po dobu 2 měsíců, pokud je uchováván při teplotách 2-8°C.

Konjugát: Zředte konjugát 6100-09 v tlumicím roztoku na ředění (konečně zředění 1/50). Zředte konjugát téhož dne, kdy provádíte testy. Naředěný konjugát neuchovávejte.

Roztok substrátu: rozpustěte tabletu substrátu fosfatázy 6100-10 v nezředěném tlumicím enzymu 6100-04 (1 tabletu ve 2,5 ml tlumicího roztoku). Mixujte až do úplného rozpuštění tablet(-y). Naředěte substrát téhož dne, kdy provádíte testy, a chraňte zkumavku před přímým světlem. Tablety a roztoky substrátu by měly být bezbarvé, pouze se slabým nažloutlým nádechem. Pokud se tableta nebo substrát zbarví dožluta, mohou být částečně hydrolyzovány a měly by být vyřazeny. Roztok substrátu neuchovávejte.

Zastavovací roztok: Použijte neředěné činidlo 6100-05.

Odebírání a příprava vzorků:

Použijte lidské sérum. Sérum by mělo být uchováváno při teplotách 2-8°C, pokud se analýza uskuteční do několika dní, v jiném případě je uchovávejte při teplotě -20°C nebo nižší. Vyhněte se opakovanému zmrazování a rozmrazování.

Rozmixujte vzorky a naředěte je 1/201 ve zředěném tlumicím roztoku (například 5 µl vzorku v 1,0 ml).

Varování a bezpečnostní opatření:

Toxické sloučeniny se vyskytují v následujících koncentracích:

Sloučenina	Odkaz	Nitrid sodný (N _a N ₃)	Merthiolát
Tlumicí roztok (10 x)	6100-02	0,1%	0,02%
Vyplachovací roztok (10 x)	6100-03	0,05%	/
Tlumicí enzym	6100-04	0,01%	/
Kontrolní sérum (20 x)	6100-06 až -08	0,1%	0,02%
Konjugát (50 x)	6100-09	0,1%	/

Všechny používané koncentráty, nitrid sodný a merthiolát nepředstavují žádné toxikologické riziko při styku s pokožkou a se slizničními membránami.

- Zastavovací roztok 6100-05 (0,5 M K₃PO₄) je dráždivý.
- Negativní, slabě pozitivní a pozitivní kontrolní sérum (6100-06 až -08) pochází z králíků.
- Zacházejte se všemi činidly a vzorky jako s potenciálně infekčním materiálem.
- Nezaměňujte činidla různých šarží nebo z různých sad Bordier ELISA.
- Nepoužívejte činidla od jiných výrobců společně s činidly z této sady.
- Nepoužívejte činidla po uplynutí doby jejich životnosti.
- Zavřete a utěsněte lahvičky s činidly bezprostředně po jejich použití a nezaměňujte jejich víčka, abyste zabránili kontaminaci.
- Pro každý vzorek použijte zvláštní a čisté pipetové nástavce.
- Nepoužívejte mikrodestičky opakovaně.
- Zabraňte poškození mikrojamek mechanickým působením (špičky/kužele, trysky).
- Popisy symbolů použitých na etiketách naleznete na webových stránkách www.bordier.ch.

Pokyny k likvidaci odpadu:

Všechny materiály používané při tomto testu jsou všeobecně považovány za nebezpečný odpad. Při likvidaci nebezpečného odpadu dodržujte příslušné státní a regionální zákony a předpisy.

Postup:

Když test běží, zabraňte tvorbě bublin na destičkách.

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 zaklepaním s proužky nad výlevkou.

Krok 2: Inkubace se vzorky séra:

Nejprve naplňte první destičku prvního proužku pomocí 100 µl samotného tlumicího roztoku pro ředění (vzorku bez séra).

Naplňte následující tři destičky samostatně pomocí 100 µl zředěného negativního, slabě pozitivního (s mezní hodnotou) a pozitivního kontrolního séra (po 100 µl). Pro testy s více než 25 vzorky doporučujeme naplnit tři poslední destičky kontrolním sérem ve funkci zdvojení (duplikace).

Naplňte zbylé destičky zředěnými vzorky (po 100 µl).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 3: Inkubace s konjugátem:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného konjugátu na každou destičku (včetně destičky vzorku bez séra).

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

Vyjměte sérum a 4 x omyjte vyplachovacím roztokem ~ 250 µl.

Krok 4: Inkubace pomocí substrátu:

Rozdělte 100 µl rozpuštěného substrátu na každou destičku.

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

Zastavte reakci přidáním 100 µl zastavovacího roztoku do každé destičky.

Krok 5: Měření absorbancí:

Pokud je to zapotřebí, otřete spodní část destiček a odstraňte bubliny. Měřte absorbance při vlnové délce 405 nm po dobu jedné hodiny po přidání zastavovacího roztoku.

Interpretace:

Odečtěte hodnotu prázdných destiček vzorku bez séra ode všech měřených hodnot. Pokud je to vhodné, vypočítejte střední hodnoty absorbance duplikovaného kontrolního séra. Test je pokládán za platný, jestliže jsou dodržena následující kritéria:

- absorbance (A) pozitivního kontrolního vzorku > 1,200
- A slabě pozitivního kontrolního vzorku > 11% A pozitivního kontrolního vzorku
- A negativního kontrolního vzorku < 8% A pozitivního kontrolního vzorku
- A vzorku bez séra < 0,350

Kontrola jakosti příslušných šarží je uvedena na našich webových stránkách: www.bordier.ch.

Koncentrace protilátek slabě pozitivního séra (s mezní hodnotou) 6100-07 byla nastavena k optimálnímu rozlišení mezi sérem klinicky dokumentovaných případů aspergilózy u imunokompetentních pacientů a sérem zdravých lidí. Index mezní hodnoty vzorku je definován po odečtení čistého vzorku bez séra jako:

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

Výsledek je **negativní**, když je absorbance analyzovaného vzorku nižší než **0,8**. 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 absorbance analyzovaného vzorku vyšší než **1,0**. V tomto případě je koncentrace protilátek IgG proti antigenům *Aspergillus fumigatus* považována za klinicky významnou. Výsledek vede k aspergilóze nebo citlivosti na aspergilózu.

V případě pozitivního nebo nejasného výsledku doporučujeme provést potvrzovací test (nejčastěji metodou Western blot), pokud je takový test k dispozici nebo ho vyžadují vnitrostátní předpisy.

Analytické výkony:

Analytická specifická:

Citlivost 22% byla zjištěna u 9 sér 5 pacientů trpících invazivní aspergilózou. V případě imunosuprimovaných pacientů se doporučuje doplnit test o detekci antigenu *A. fumigatus* v séru. Specificita 97% byla zjištěna u 36 sér 24 pacientů trpících jinou respirační chorobou než aspergilózou (kandidózou, tuberkulózou, pneumocystózou a kryptokokózou).

U suprafyziologických koncentrací hemoglobinu, lipidů nebo bilirubinu v séru doplněných interferenty nebyla pozorována žádná pozitivní ani negativní interference.

Přesnost:

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 (absorbance)	0,352	1,767	0,410	1,985
Standardní odchylka (absorbance)	0,027	0,069	0,038	0,096
Koeficient odchylky (%)	7,6	3,9	9,3	4,8

Následující hodnoty nelze stanovit, protože pro tuto analýzu není k dispozici žádný certifikovaný referenční materiál:

- Analytická citlivost (meze detekce a kvantifikace)
- Přesnost
- Pravdivost
- Rozsah měření
- Linearita

Klinické výkony:

Diagnostická citlivost:

Citlivost 97% byla zjištěna u 230 sér 147 pacientů trpících různými aspergilózami (104 případy chronické plicní aspergilózy (včetně 17 aspergilomů) a 43 případů alergické bronchopulmonální aspergilózy).

Diagnostická specifická:

Specificita 90% byla zjištěna u 206 sér 205 pacientů s respiračními symptomy, u nichž bylo vyloučeno onemocnění související s houbou *Aspergillus*.

Pozitivní a negativní prediktivní hodnota:

U výše uvedených populací byly zjištěny hodnoty PPV 92% a NPV 96%.

Očekávané hodnoty u normální a postižené populace:

V běžné populaci 99 švýcarských dárců krve, v 98 sérech ze švýcarského infekčního oddělení a v 90 sérech pacientů s podezřením na aspergilózu, u nichž však bylo toto onemocnění s jistotou vyloučeno, činí očekávaná hodnota indexu 0,16. V zasažené populaci 63 sér pacientů trpících různými druhy aspergilózy činí očekávaná hodnota indexu 2,16.

Incidenty:

Každý závažný incident, k němuž v souvislosti s tímto prostředkem dojde, je nutné oznámit výrobcí a příslušnému orgánu členskému státu, v němž je uživatel anebo pacient usazen.

Omezení:

Diagnóza infekčního onemocnění by neměla být stanovována na základě jediného výsledku testu. Přesná diagnóza by měla brát v úvahu endemickou situaci, klinickou historii, symptomatologii, zobrazování a také sérologické údaje.

U imunokompromitovaných pacientů a u novorozenců mají sérologické údaje omezenou vypovídací hodnotu.

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**.



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

51239_03 6100 CZE 01.2023



4/4