

## ELI.H.A *Aspergillus*

Sérodiagnostika aspergilózy pomocí nepřímé hemaglutinace

102 testů  
(kat.č. 44602)



verze: 8000110-en-2010-02

### 1- ÚČEL

**ELI.H.A *Aspergillus*** umožňuje kvantitativní určení anti-*Aspergillus fumigatus* sérových protilátek nepřímou hemaglutinací. Každá souprava je určena pro provedení 102 testů nebo 17 reakcí po 6 ředěních.

### 2- ÚVOD

*Aspergillus fumigatus* je nejčastěji obviňovaný druh v lidské patologii. *A. fumigatus* má zvláštní schopnost parazitické adaptace u člověka.

Nicméně pro jeho rozvoj jsou nutné některé příznivé podmínky:

- místní podmínky (předvytvořené dutiny, čištěné plicní abscesy, postižené sliznice...);
- všeobecné podmínky (imunosuprese po velkých chirurgických výkonech nebo medicínských postupech: transplantaci orgánů, léčbě imunosupresivy, steroidy, antibiotiky...).

### 3- PRINCIP

**ELI.H.A *Aspergillus*** je založena na principu nepřímé hemaglutinace. Senzibilizované erythrocyty jsou beranými erythrocyty potaženými antigenem *Aspergillus fumigatus*. Přítomnost specifických sérových protilátek vede k aglutinaci senzibilizovaných erythrocytů projevující se jako kalná červeno/hnědá usazenina potahující jamku. V nepřítomnosti specifických protilátek vytvoří erythrocyty usazeninu ve tvaru prstence na dně jamky.

Nesenzibilizované erythrocyty zajišťují specifičnost reakce, což umožňuje vyloučit jakoukoliv interferenci způsobenou přirozenými anti-ovčími aglutininy (Forssman heteroprotiilátky, protiilátky infekční mononukleózy). Reakce se provádí na mikrotitrační destičce tvaru U. Provádění testu je snadné a rychlé, s výsledkem do 2 hodin.

### 4 – REAGENCIE A MATERIÁL

Popis	Množství
<b>R1</b> : Lahvička s 2.2 ml senzibilizovaných erythrocytů	1
<b>R2</b> : Lahvička s 1 ml nesenzibilizovaných erythrocytů	1
<b>BUF</b> : Lahvička s 55 ml fosfátového pufru pH 7.2	1
<b>R3</b> : Lahvička s 2 ml adsorbentu	1
<b>CONTROL +</b> : Lahvička s 0.2 ml titrované pozitivní kontroly	1
<b>CONTROL -</b> : Lahvička s 0.2 ml negativní kontroly	1
<b>MICROPLATE</b> : Mikrotitrační destičky s U-dnem	2
<b>DROPPER</b> : Speciální kapátko	2

### 5- OPATŘENÍ

- Reagencie jsou určeny pouze pro *in vitro* použití a musí s nimi manipulovat pouze školený personál.
- Všechny reagencie kromě **BUF** reagencie obsahují surový materiál živočišného původu a musí s nimi být zacházeno s opatrností.
- Vzorky pacientů jsou potenciálně infekční; musí s nimi být zacházeno opatrně, v souladu s hygienickými pravidly a aktuálními předpisy pro daný typ produktu a zemi jeho použití.
- CONTROL** reagencie obsahují azid sodný (< 0.1 %).
- Nepoužívejte reagencie po datu expirace.
- Nepoužívejte reagencie různých čísel šarží.
- Nechte reagencie a sérum před použitím vytemperovat na pokojovou teplotu.
- Před použitím reagencie **R1** a **R2** opatrně protřepejte.
- Při dávkování reagencie **R1** a **R2** se ujistěte, kapátko máte zcela vertikálně. Ověřte nepřítomnost vzduchových bublin v kapkách kvůli zajištění stálého objemu kapky.

### 6 – ODBĚR VZORKŮ A JEJICH OŠETŘENÍ

Používejte čerstvé sérum nebo sérum skladované při -20°C, a takové, které nevykazuje známky hemolýzy, zakalení nebo kontaminace.

Vyvarujte se opakovanému zamrazování a rozmrazování.

Neodstraňujte komplement ze séra.

### 7– STABILITA, SKLADOVÁNÍ A PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Reagencie jsou připraveny k použití.

Všechny reagencie uchovávané při 2-8°C v původním obalu jsou stabilní do data expirace uvedeného na krabici. Nezamrazujte.

## **8- POŽADOVANÝ, ALE NEDODÁVANÝ MATERIÁL**

- Automatická pipeta s objemem pipetování přizpůsobeným odměřenému objemu;
- Nádoba na odpadní materiál;
- Centrifuga;
- Hemolyzační zkumavky.

## **9-METODA**

Nechejte před použitím všechny reagensie vytemperovat na pokojovou teplotu.

### **9.1- Příprava vzorků**

Provedte ředění testovaného séra 1:40:

- 50  $\mu$ l séra;
- 1.95 ml **BUF** reagensie.

### **9.2- Realizace testu na mikrodestičce**

- S použitím multikanálové pipety přidejte 50  $\mu$ l **BUF** reagensie do 8 jamek mikrodestičky.
- S použitím mikropipety přidejte 50  $\mu$ l ředěného séra do 1. jamky. Smíchejte sérum s **BUF** reagensií a proveďte sériové ředění, nejlépe pomocí mikrodilutoru a to přenesením 50  $\mu$ l z 1. jamky do 2. jamky, potom 50  $\mu$ l z 2. jamky do 3. jamky a tak dále dokud nedojdete do 6. jamky. 50  $\mu$ l z 6. jamky je zlikvidováno. Tímto způsobem získáte ředění 1:80 až 1:2560.
- Přidejte 50  $\mu$ l ředěného séra do 7. jamky. Smíchejte sérum s **BUF** reagensií a odstraňte 50  $\mu$ l. Toto ředění (1:80) je kontrola séra, jejíž rolí je detekce přirozených anti-ovčích aglutininů, které se v některých vzorcích mohou vyskytnout.
- Opatrně protřepejte reagensie **R1** a **R2**.
  - Přidejte 1 kapku **R1** reagensie do prvních 6 jamek.
  - Přidejte 1 kapku **R2** reagensie do 7. jamky (kontrola séra).
  - Přidejte 1 kapku **R1** reagensie do 8. jamky (reagenční kontrola), jejíž rolí je kontrola validity reagensií **BUF** a **R1**.

Poznámka: Na každou sérii testů proveďte pouze jednu reagenční kontrolu.

- Velmi opatrně promíchejte obsah jamek:
  - Bud' ručně, poklepáváním na stranu mikrodestičky, která je položená naplocho na stole;
  - Nebo použitím vibrační třepačky pro mikrotitrační destičky (například 1300 rpm po dobu 10 sekund). Nepoužívejte orbitální třepačku.
- Nyní nechejte destičku ležet stranou od zdroje vibrací.
- Destičku lze odečítat po 2 hodinách.

### **9.3- Adsorpce přirozených anti-ovčích aglutininů v případě aglutinace sérové kontroly**

- Opatrně protřepejte reagensii **R3**.
- Do zkumavky přidejte a promíchejte:
  - 0.1 ml séra;
  - 0.3 ml **R3** reagensie.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 60 minut.
- Centrifugujte při 2000 rpm po dobu 15 minut.
- Odeberte supernatant; sérum je nyní naředěno 1:4.
- Proveďte ředění supernatantu 1:10 v **BUF** reagensii pro získání zásobního adsorbovaného ředění (1:40).
- Postupujte dle kroků popsanych v "Realizace testu na mikrodestičce", ale zaměňte zásobní ředění séra za adsorbované zásobní ředění.

## **10-ODEČTÁNÍ**

### **Negativní reakce**

### **Absence hemaglutinace**

Přítomnost většího nebo menšího prstence na dně jamky.

### **Pozitivní reakce**

### **Přítomnost hemaglutinace**

Přítomnost zakalené červeno/hnědé usazeniny potahující jamku; někdy je zde přítomný jemné periferní hranice.

Příklad: sérum je pozitivní v ředění 1:1280



## 11 – INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

- Titř < 1:320:** **Žádná významná reakce.**  
Pravděpodobná nepřítomnost hluboké infekce aspergilózy.  
Opakujte test po 2 až 3 týdnech a rovněž proveďte elektrosynerézu nebo imunoelektroforézu.
- Titř = 1:320** **Diskutabilní reakce.**  
Opakujte test po 2 až 3 týdnech a rovněž proveďte elektrosynerézu nebo imunoelektroforézu.
- Titř ≥ 1:640:** **Významná reakce ve prospěch hluboké infekce aspergilózy.**

## 12– INTERNÍ KONTROLA KVALITY

**CONTROL +** a **CONTROL –** reagensie se musí ošetřit jako testovaná séra. Titř reagensie **CONTROL +** musí být stejný jako titř vytištěný na štítku lahvičky ± jedno ředění. Nesmí se objevit hemaglutinace **CONTROL –**. Pokud je hemaglutinace přítomná, je test neplatný.

## 13– PŘÍČINY CHYB A LIMITY TESTU

- Špatné skladování séra.
- Špatné skladování reagensií po otevření.
- Používejte pouze kapátka dodávané se soupravou.
- Nezaměňujte kapátka mezi reagensiemi **R1** a **R2**.
- V případě pozitivní reakce v prvních 6 jamkách proveďte další sériové ředění kvůli určení konečného titru hemaglutinace.
- Kontrola séra musí být negativní (prsteneček). V případě hemaglutinace této kontroly je nezbytné znovu provést test po eliminaci přirozených anti-ovčích aglutininů adsorpčí.
- Reagenční kontrola musí být negativní (prsteneček). V případě hemaglutinace této kontroly nelze test **ELI.H.A Aspergillus** použít.
- Některá séra, u kterých je vysoká koncentrace protilátek, mohou poskytovat zónový fenomén (bez zakalení) v úvodních ředěních, který se neobjevuje v dalších ředěních.
- Kvalita reagensií umožňuje provést test večer a odečíst reakci druhý den ráno, v případě že mikrodestička je zcela v klidu a je chráněna před zdroji vibrací.
- Ve všech případech je nezbytné, aby pro stanovení konečné diagnózy byla brána v potaz klinická, epidemiologická a biologická data.

## 14- FUNKČNOST

**ELI.H.A Aspergillus** sestává z červených krvinek senzibilizovaných antigenem *Aspergillus fumigatus*, který zajišťuje specifčnost a citlivost reakce nepřímé hemaglutinace. Hodnocení ukázalo, že test má citlivost 80% a specifčnost 98%.

## 15– LIKVIDACE ODPADU

Odpad je třeba likvidovat v souladu s hygienickými pravidly a aktuálními směrnici pro tento typ produktu v zemi jeho použití. V případě náhodného vylití **BUF** reagensie, očistěte pracovní plochu absorpční utěrkou a vodou. Pokud se na pracovní plochu vylíje sérum nebo jiná reagensie, použijte absorpční papír a přípravek s chlorem.

## 16 - LITERATURA

1. J. CAPDEVILLE, S. FIABANE - Diagnostic immunologique des aspergilloses - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XII, N° 121, 205-249.
2. B. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie -*Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, N° 123, 417-455.
3. J.-M. SENET, C. BRISSET - The diagnosis of aspergillosis by passive haemagglutination - *Biomedicine*, 1973, 19, 365-368.
4. J.-M. SENET, R. ROBERT, E. PICHOT - Intérêt de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic précoce de l'aspergillose - *Bulletin de la Société de Mycologie Médicale*, 1974, Tome III, N° 1, 45^48.
5. J.-M. SENET, R. ROBERT - Intérêt de l'hémagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmose et à l'aspergillose - *Archives Médicales de l'Ouest*, 1979, Tome 11, N° 1, 39^42.
6. A. CULINO, M. MIEGEVILLE, O. MORIN - Apports de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire - *Feuillets de Biologie*, 1984, Vol. XXV, N° 137, 51/57.
7. M. MIEGEVILLE, O. MORIN, C. VERMEIL - Etude sérologique rétrospective concernant une série d'aspergillose es à "hauts risques" - *Feuillets de Biologie*, 1986, Vol. XXVII, N° 148, 37-39.
7. M.-C. GBADAMASSI, C. CIVADIER, T. SANDRE, T.-H. DUONG, C. COMBESCOT - Diagnostic immunologique de l'aspergillose : Proposition de l'association de deux techniques facilement mises en œuvre au laboratoire - *Feuillets de Biologie*, 1989 , Vol. XXX, N° 169, 31-34.