

Souprava *Candida albicans* IgA ELISA

Semi-kvantitativní test pro *Candida albicans* IgA

Souprava *Candida albicans* IgM ELISA

Semi-kvantitativní test pro *Candida albicans* IgM

Souprava *Candida albicans* IgG ELISA

Semi-kvantitativní test pro *Candida albicans* IgG

Kódy výrobků GD 19, 20 a 22 (96 testů)

Pouze pro diagnostiku *in vitro*

2001-10-29

1. Použití souprav

ELISA soupravy *Candida albicans* IgA, IgM a IgG jsou určeny k detekci protilátek proti *Candida albicans* v lidském séru, a to ve třídách IgA, IgM nebo IgG. Mají pomáhat v diagnostice infekcí způsobených *Candida albicans*. Všechny součásti těchto souprav jsou určeny pouze pro diagnostiku *in vitro*.

2. Význam testu

Z trávicí trubice se do vnitřních orgánů může systematicky šířit značný počet houbových patogenů. *Candida albicans* a *Candida tropicalis* jsou u lidí příčinou 80 % infekcí způsobených rodem *Candida*. *Candida* pravděpodobně vstupuje do těla novorozence již v prvních dnech jeho života, a stává se normálním obyvatelům lidského střeva. Systémová kandidóza je houbová infekce vnitřních orgánů, která pochází z nadměrného růstu a šíření *Candidy*. Je významnou příčinou úmrtí pacientů s oslabenou imunitou a rovněž těch pacientů, kteří prodělali dlouhodobé léčení antibiotiky. Dárci krve se běžně netestují na infekci *Candidou*, proto může být *Candida* přenesena i při transfúzi krve. Se zvýšenou úrovní *Candida* IgG se také setkáváme u pacientů starších 60 let.

Infekce se systémovou kandidózou je charakterizována zvýšeným titrem IgM a IgG. Protilátky *Candida* IgA jsou spojovány s infekcí mukózní membrány. Doporučujeme, aby pacienti s podezřením na kandidózu byli otestováni na všechny tři třídy protilátek.

3. Princip testu

Předředěné vzorky séra se inkubují s antigeny *C. albicans* ukotvenými na stěnách jamek mikrotitrační destičky. Po vymytí nenavázaných komponent vzorků séra se do jamek přidá králičí anti-lidský IgG konjugovaný s peroxidázou. Ten se při druhé inkubaci naváže na protilátky již navázané na povrchu jamky. Nenavázaný konjugát se odstraní promytím a do jamek se přidá 3,3-5,5-tetramethylbenzidin (TMB) a enzymatický substrát, vzniká barevné reakce, která se zastaví přidáním stop-roztoku, který stabilizuje vzniklé zbarvení. Optické denzity (OD) standardů, pozitivních kontrolních vzorků a testovaných vzorků se měří pomocí ELISA readeru s filtrem 450 nm. OD je přímo úměrná aktivitě protilátek ve vzorku.

4. Materiály obsažené v soupravě

- **Mikrotitrační destička:** 96 jamek v lomitelných stripech 12 X 8, pokrytých antigeny *C. albicans*, s držákem, zabalená v plastovém sáčku s vysoušedlem.
- **Reagent 1: Roztok pro zředění vzorků,** 100mM, pufovaný solný koncentrát, pH 7,2, s antimikrobiální ochranou, obsah 15 ml, (barva modrá). Rozřeďte ve 100 ml.
- **Reagent 2: Promývací pufr** 15mM pufovaný koncentrát pH 7,2, obsah 75 ml, 15násobný koncentrát.
- **Reagent 3: Konjugát** králičí anti-lidský IgA (žlutý), nebo IgM (zelený) nebo IgG (červený) konjugovaný s peroxidázou, v roztoku stabilizujícím proteiny s antimikrobiální ochranou, obsah 15 ml, (barva modrá). Obsah rozřeďte ve 100 ml.
- **Reagent 4: Substrát TMB,** vodný roztok TMB a peroxidu vodíku, obsah 12 ml, k okamžitému použití.
- **Reagent 5: Stop roztok,** 0,24M kyselina sírová, obsah 12 ml, k okamžitému použití.
- **Standardy:** 1ml 10mM pufovaného solného roztoku obsahujícího lidské protilátky proti *C. albicans* IgA (0, 50 U/ml), nebo IgM (0, 10 U/ml) nebo IgG (0, 12,5, 25, 50 a 100 U/ml), připravené k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek,** 1ml 10mM pufovaného solného roztoku obsahujícího buď protilátky IgA, IgM nebo IgG lidského séra proti *C. albicans*. Připraveno k okamžitému použití.
- **Návod k použití.**

5. Další potřebná vybavení

- Zkumavky pro roztoky • kalibrováný odměrný válec pro přípravu promývacího pufru • přesné pipety a jednorázové špičky pro dávkování 5 μ l, 100 μ l a 1 ml • promývačku mikrotitračních destiček nebo multiplexní pipetu, nebo promývací nádobu • deionizovaná voda • savý papír • ELISA reader s filtrem 450 nm a případně s referenčním filtrem 620 nm

6. Opatření

6.1 Bezpečnostní opatření

1. Všechny reagenty v této sadě jsou pouze pro diagnostické použití *in vitro*.
2. Tento test může používat pouze zkušený laboratorní personál. Je nezbytné přesně dodržet testovací protokol.
3. Veškerý materiál získaný z lidského těla, který byl použit při přípravě standardů a pro pozitivní kontrolní vzorek tohoto výrobku byl testován na přítomnost protilátek proti HIV, HbsAg a HCV, a byl shledán negativním. Avšak žádná testovací metoda nemůže nabídnout naprostou jistotu, že v materiálu nejsou přítomny infekční látky. Proto se se všemi reagenty obsahujícími materiál získaný z lidského těla musí zacházet jako s materiálem potenciálně infekčním. Při práci se sérem pacienta nebo s produkty vyrobenými ze séra by laboranti měli mít rukavice a ochranný oděv.
4. Reagenty v této soupravě obsahují antimikrobiální přísady a roztok substrátu obsahuje 3,3-5,5-tetramethylbenzidin. Zabraňte potřísnění pokožky a vniknutí do očí. Pokud dojde k jakémukoli kontaktu, postižená místa okamžitě důkladně opláchněte velkým množstvím vody
5. Stop-roztok obsahuje 0,25M kyselinu sírovou. Zabraňte potřísnění pokožky a vniknutí do očí. Pokud dojde k jakémukoli kontaktu, postižená místa okamžitě důkladně opláchněte velkým množstvím vody
6. Každá kapalina, která přišla do kontaktu s potenciálně infekčním materiálem musí být vyhozena do kontejneru s dezinfekčním prostředkem. Likvidace musí být prováděna v souladu s místní legislativou.

6.2 Technická opatření

1. Stripy a roztoky se nesmí používat, pokud je jejich obal porušen, nebo pokud roztoky prosakují.
2. Před použitím ponechte všechny reagenty i mikrotitrační destičku dosáhnout pokojové teploty. Postarejte se o to, aby sáček z plastové fólie s nepoužitými stripy byl dobře a těsně uzavřen, a aby v něm bylo vysoušedlo. Po použití jej skladujte při teplotě 2 – 8°C.
3. Při každém testu proveďte i pozitivní kontrolu, abyste mohli monitorovat stabilitu reagentu a správný průběh analýzy..
4. Důsledně dodržujte předepsanou dobu a teplotu inkubace.
5. Zajistěte, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi jamkami. Všechny pipety a další zařízení použité pro enzymatický konjugát ukládejte zcela mimo reagent substrátu.
6. Při dávkování konjugátu nebo substrátu pipetou, by se měly nabírat alikvotní množství potřebná pro daný počet jamek, aby se zabránilo opakovanému styku špiček pipet s obsahem ampulí s reagenty. Nepoužité reagenty nikdy nevracejte zpět do původních ampulí..
7. Mezi inkubačními kroky nedovolte jamkám vyschnout.
8. Přesně dodržujte předepsaný postup. Nedostatečné promytí může způsobit silný falešný signál.
9. Během všech inkubačních kroků zabraňte vystavení vzorků přímému slunečnímu záření a zdrojům tepla.
10. Na ampule nasaďte správné barevné uzávěry, abyste zabránili křížové kontaminaci.
11. Je důležité, aby všechny testované vzorky i pozitivní kontrolní vzorek byly rozděleny do jamek bez časové prodlevy. Proto se postarejte o to, aby byly všechny vzorky náležitě připraveny k dávkování.

7. Skladovatelnost a skladovací podmínky

Soupravu skladujte při teplotě 2 – 8°C. Otevřená souprava zůstává stabilní po dobu 3 měsíců (nebo, pokud je tato doba kratší, do vypršení lhůty expirace). Žádnou část sady nezmrazujte. Skladovatelnost rozředěného promývacího pufru a ředící kapaliny je 3 měsíce, pokud je uložen v uzavřené nádobě při teplotě 2 – 8°C.

8. Odběr a uložení vzorků

Vzorky sera by se měly pro použití dlouhodobě skladovat při teplotě –20°C. Zmrazené vzorky se musí po rozmrazení před použitím dobře promíchat. Opakované zmrazování a rozmrazování může ovlivnit výsledky testu. Nesmí se používat vzorky, které jsou kontaminované mikroby, zahřáté nebo vzorky, které obsahují částice pevné hmoty. Pro testy by se neměly používat silně hemolizované nebo lipemické vzorky.

9. Příprava reagentů

1. Smíchejte roztok pro ředění vzorků (**Reagent 1**) se 100 ml destilované vody. Tento zředěný pufr je stabilní po dobu 3 měsíců.

2. Smíchejte promývací pufr (**Reagent 2**) s destilovanou vodou v poměru 1 : 14, abyste měli dostatečné množství pufri pro provedení testu.

10. Postup analýzy

- Ředícím roztokem naředte vzorky v poměru 1 : 200 (např. 5 µl sera s 1 ml roztoku).
- Nechejte zředěné vzorky stát po dobu **30** minut. Roztok pro ředění vzorků obsahuje imunoabsorbent, který odstraní protilátky, které nevznikly reakcí na *Candida albicans*.
- Připravte si potřebný počet stripů pro test.
- Do příslušných jamek pipetujte 100 µl standardů, pozitivní kontroly a zředěný vzorků od pacientů.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30** minut.
- Po 30 minutách odsajte obsah jamek a třikrát jamky promyjte automatickou promývačkou mikrotitračních destiček nebo použijte manuální promývací postup (viz níže). Pečlivé promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Před pokračováním nechte jamky odkapat na savý papír. **Nenechte jamky vyschnout.**

Postup pro ruční promývání:

Vyprázdněte jamky obrácením mikrotitrační destičky. Pomocí multikanálové pipety nebo promývacího hřebínku naplňte jamky promývacím pufrem. Jamky vyprázdněte obrácením destičky a nechejte odkapat na savém papíře. Tyto kroky opakujte ještě třikrát.

- Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu (**Reagent 3**). Inkubujte jamky po dobu **30** minut při pokojové teplotě.
- Po 30 minutách odstraňte obsah jamek a pečlivě jamky 4krát promyjte promývacím pufrem. Nechejte mikrotitrační destičku odkapat na savém papíru, abyste odstranili poslední kapky promývací kapaliny.
- Multikanálovou pipetou přidejte do všech jamek 100 µl TMB substrátu (**Reagent 4**). Inkubujte destičku po dobu **10** minut.
- Do jamek přidejte 100 µl stop-roztoku. Aby byla doba reakce pro všechny jamky stejná, je potřeba do jamek stop-roztok přidávat ve stejném pořadí v jakém byl do nich přidáván TMB substrát.
- Měřte OD každé jamky ELISA readerem s filtrem 450 nm. Jako referenční filtr je možno použít filtr 620 nm.

11. Kontrola jakosti

Údaje pro kontrolu jakosti jsou uvedena na certifikátu vydaného pro příslušnou šarži, který je přiložen k sadě.

Pozitivní kontrolní vzorek má sloužit pro monitorování případného selhání reagentů.

Každá jamka, která je podle spektrometru pozitivní, ale nemá viditelné zabarvení, by měla být očištěna ze spodní strany a znovu změřena readerem. Pokud jsou zaznamenány hodnoty OD nižší než nula, měly by být verifikovány použité vlnové délky, reader by měl být opět vynulován a měření je třeba zopakovat.

12. Interpretace výsledků

IgA

Sestrojte kalibrační křivku OD pro standardy 0 a 50 U/ml. Z této křivky odečtěte hodnoty měřených vzorků. V naší laboratoři jsme stanovili prozatímní hodnoty nižší než 10 U/ml. Pacienti s hodnotami IgA nad 10 U/ml pravděpodobně prodělali nebo právě prodělávají infekci *Candidou*.

IgM

Sestrojte kalibrační křivku OD pro standardy 0 a 50 U/ml. Z této křivky odečtěte hodnoty testovaných sér. Vzorky s hodnotou optické hustoty nad 10 U/ml jsou pozitivní na *C. albicans* IgM. Přítomnost protilátek je indikátorem reakce hostitele na nedávnou infekci *Candidou*, ale výsledky musí být vždy vyhodnoceny s ohledem na klinické informace o pacientovi.

IgG

Sestrojte kalibrační křivku OD pro standardy. Z této křivky odečtěte hodnoty testovaných sér. Pro *Candida* IgG jsme určili normální hodnoty nižší než 30 U/ml. Přítomnost protilátek *Candida* IgG je indikátorem reakce hostitele na infekci *Candidou*, ale výsledky musí být vždy vyhodnoceny s ohledem na klinické informace o pacientovi.

13. Omezení a limity tohoto postupu

- Pozitivní test nemusí nezbytně indikovat infekci protože protilátky proti druhům rodu *Candida* mohou být detekovány i u neinfikovaných jedinců, kteří byli vystaveni kvasinkám.
- Testy nejsou schopny rozlišit protilátky vytvořené během mukózní kolonizace od těch, které se vytvořily produktů během silné infekce. V důsledku toho se protilátky nacházejí u mnoha hospitalizovaných pacientů, kteří zjevně nebyli infikováni *Candidou*.
- Negativní výsledky testu podobně nezbytně nevyloučí možnost pevně usazenou kandidózu u pacientů s oslabeným imunitním systémem, kteří nejsou schopni si příslušné protilátky vytvořit.
- Testy na přítomnost protilátek mají diagnostickou hodnotu, za toho předpokladu, že výsledky jsou interpretovány opatrně a s souvislostí s dalšími klinickými a laboratorními nálezy. Nejužitečnější jsou tehdy, kdy se po určitou dobu provádí série testů v pravidelných intervalech.

Velké množství protilátek nebo jejich náhlý nárůst ukazuje na infekci a naopak jejich snížení indikuje uzdravování.

14. Charakteristiky testu

Efektivnost testu *Candida* IgG ELISA byla testována s použitím vzorků dodaných firmou UK NEQAS. Obdržené výsledky byly porovnány s danými reakcemi (DR), které byly získány společně se vzorky. Viz tabulka.

	DR +	DR-
<i>Candida</i> IgG ELISA +	5	1
<i>Candida</i> IgG ELISA -	1	12

15. Opakovatelnost

Candida IgA ELISA

Koeficient odchylky v rámci analýzy: 4 - 8%

Koeficient odchylky v mezi analýzami: 5 - 12%

Candida IgM ELISA

Koeficient odchylky v rámci analýzy: 4 - 6%

Koeficient odchylky v mezi analýzami < 12%

Candida IgG ELISA

Koeficient odchylky v rámci analýzy: 4 - 7%

Koeficient odchylky v mezi analýzami < 12%

Shrnutí Metody

- Sérum zředte v poměru 1 : 200 ředícím roztokem (**Reagent 1**).
- Inkubujte vzorky v ředícím roztoku po dobu 30 minut.**
- Přidejte standardy (podle požadavků), pozitivní vzorek a zředěné vzorky do jamek mikrotitrační destičky.
- Inkubujte po dobu **30** minut při pokojové teplotě.
- Jamky třikrát promyjte.**
- Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu (**Reagent 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30** minut.
- Jamky čtyřikrát promyjte.**
- Do každé jamky přidejte 100 µl substrátu TMB (**Reagent 4**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **10** minut.
- Do každé jamky přidejte 100 µl stop-roztoku (**Reagent 5**).
- Měřte na ELISA readeru s filtrem 450 nm (jednoduchá vlnová délka) nebo s filtry 450 a 620 nm (dvojitá vlnová délka).

Obdobná literatura

- Faux, J A et al (1992) Comparison of specific IgG antibody levels to the cell wall mannan of *Candida albicans* in normal individuals and in patients with primary antibody deficiency. *J Immunol Methods* 153, 167 - 172
- McHugh T M et al (1989) Development of a microsphere based fluorescent immunoassay and its comparison to an enzyme immunoassay for the detection of antibodies to three preparations of *Candida albicans* *J Immunol Methods* 116, 213-219
- Burnie J P et al (1985) Outbreak of systemic *Candida albicans* in intensive care unit caused by cross infection. *Brit Med J* 290, 746-748
- Crook, W G (1983) The yeast connection: A medical breakthrough. Professional Books, PO Box 3494, Jackson, TN 38301
- Robinet, RW Asthma due to *C. albicans* *Univ Michigan, Med Centre Bulletin* 34, 12 - 15
- Ray, TL (1980) Fungal infections in the immuno-compromised host. *Med Clin N America* 64, 955 - 968.
- Wojdani, A M et al (1986) Measurement of humoral and cellular immunity for the diagnosis of Candidiasis. *Clin Ecol* 4, 210



Výrobce:

Genesis Diagnostics Ltd.

Eden Research Park, Henry Crabb Road, Littleport,
Cambridgeshire, CB6 1SE, United Kingdom
Tel: 01353 862220 Fax: 01353 863330

Distributor:

LABOSERV s.r.o.

Hudcova 78b, 612 00 Brno
Tel: +420 541 243 113, Fax: +420 541 243 114
e-mail: laboserv@laboserv.cz