

Aspergillus IgG ELISA

Kvantitativní test pro zjištění protilátek *Aspergillus fumigatus* IgG v lidském séru

Kód výrobku GD 29

96 testů

Reagenty v této soupravě jsou určeny pouze pro *in vitro* diagnostické použití

210302

Použití

ELISA souprava Aspergillus IgG představuje rychlou imunochemickou metodu stanovení protilátek proti *Aspergillus fumigatus* v lidském séru s detekcí ELISA readerem. Komponenty obsažené v této soupravě jsou určeny pouze pro *in vitro* diagnostiku.

Úvod

Aspergillus je rozšířen v půdě, větracích systémech, stavebních materiálech a také v rostlinných a živočišných materiálech. Jeho spóry se uvolňují do ovzduší odkud se vdechováním dostávají do těla. Onemocnění způsobená Aspergillum mohou být způsobena řadou mechanismů včetně alergie na spóry (aspergilloma) a aktivní invaze houby. *Aspergillus fumigatus* je z lékařského hlediska nesporně jedním z nejdůležitějších organismů. Invazivní infekce u febrilních pacientů s cytopenií a s hematologickými zhoubnými nádory se velmi obtížně diagnostikují. Včasná diagnóza infekce Aspergillum a rychlé nasazení antifungální léčby může vést k lepším terapeutickým výsledkům (Aisner a další. 1977). Metoda ELISA je přesnější a citlivější než imunoprecipitační metody.

Princip testu

Souprava Aspergillus IgG obsahuje mikrotitrační destičku s 96 jamkami. Předředěné vzorky séra se inkubují s purifikovanými antigeny Aspergilla obsaženými v jamkách mikrotitrační destičky. Po vymytí nenavázaných komponent séra se do jamek přidá králičí anti-lidský IgG konjugovaný s křenovou peroxidázou. Při druhé inkubaci se tento naváže na lidské protilátky již navázané na povrchu. Nenavázaný konjugát se odstraní promytím a do jamek se přidá 3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin (TMB) a enzymatický substrát, čímž dojde k barevné reakci se specifickými protilátkami. Reakce se zastaví přidáním stop-roztoku, který také vzniklé zbarvení stabilizuje. Optická denzita (OD) standardů, kontrolních vzorků a testovaných vzorků se měří pomocí ELISA readeru s filtrem 450 nm. OD je přímo úměrná aktivitě protilátek v vzorku.

Materiály obsažené v soupravě

- **Mikrotitrační destička** 96 jamek ve stripech 12 X 8, pokrytých antigeny Aspergillus.
- **Reagent 1:** Ředící roztok, 15násobný koncentrát, 15 ml, modrý, před použitím rozředte.
- **Reagent 2:** Promývací pufr 15násobný koncentrát, 75 ml, modrý, před použitím rozředte.
- **Reagent 3:** Konjugát (roztok HRP-anti-IgG), 12 ml, k okamžitému použití, červený.
- **Reagent 4:** Substrát TMB, 12 ml, k okamžitému použití.
- **Reagent 5:** Stop roztok, 12 ml, k okamžitému použití
- **Standardy:** 0, 12,5, 25, 50 a 100 U/ml, po 1 ml, k okamžitému použití.
- **Pozitivní kontrolní vzorek,** 1ml, k okamžitému použití
- **Návod k použití**

Další zařízení potřebná k testu

Zkumavky velikosti 10mm X 60mm pro ředění vzorků, automatické pipety 10 µl, 100 µl, dávkovač, reader mikrotitračních destiček s optickým filtrem 450 nm, promývačka mikrotitračních destiček, deionizovaná voda, běžné laboratorní zařízení.

Skladování a bezpečnostní opatření

Po dodání soupravu skladujte při teplotě 2 – 8°C. Po otevření je souprava stabilní po dobu 3 měsíců (pokud její expirační doba není kratší než tyto 3 měsíce). Je důležité, chránit nepoužité jamky před nadměrnou vlhkostí. Soupravu nepoužívejte po vypršení expirační doby. Standardy jsou vyrobeny z rozředěného neinfekčního lidského séra. Vždy je nutno dodržet běžné laboratorní bezpečnostní postupy. Při práci se sérem pacientů nebo s jakýmkoli produkty vyrobenými z lidského séra je nutno používat rukavice a ochranný oděv. Stop roztok obsahuje 0,25M kyselinu sírovou (žiravina).

Vzorky

Vzorky by se měly analyzovat v den jejich odběru, nebo by se měly skladovat při teplotě –20 °C. Opakované zmrazování a rozmrazování může negativně ovlivnit výsledky testů.

Pracovní postup

Před začátkem práce nechte všechny materiály vytemperovat na pokojovou teplotu.

Rozředte promývací pufr (**Reagent 2**) destilovanou vodou v poměru 1:14. Zředěný pufr je při teplotě 2 – 8°C stabilní po dobu dvou měsíců. Koncentrovaný pufr skladovaný při teplotě 2 – 8°C je stabilní až do data jeho expirace.

Připravte si příslušný počet stripů potřebný pro provedení testu. Standardy doporučujeme testovat v duplikátu. Vzorky lze testovat i v monoplikátu.

Pracovní koncentraci ředícího roztoku vzorků připravte zředěním koncentrátu (**Reagent 1**) deionizovanou vodou v poměru 1:14. Pacientské vzorky rozředte takto připraveným pufrům v poměru 1 : 200.

Do příslušných jamek pipetujte 100 µl standardu, kontroly nebo zředěného vzorku. Je důležité, aby všechny vzorky i standardy byly do jamek pipetovány bez větších prodlev. **Příliš pomalé dávkování nebo delší prodlevy, mohou negativně ovlivnit výsledky testu.**

Mikrotitrační destičku inkubujte po dobu **30 minut** při pokojové teplotě. Při všech inkubacích se vyvarujte prudkého osvětlení vzorků a jejich vystavení zdrojům tepla.

Odstraňte obsah jamek a třikrát je promyjte 350 µl promývacího roztoku/jamka. Pečlivé promytí je klíčem k dobrým výsledkům. Před dalším krokem jemně osušte povrch mikrotitrační destičky savým papírem. **Jamky nesmí vyschnout.**

Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu (**Reagent 3**). Pipety a další zařízení použité pro manipulaci s konjugátem uchovávejte odděleně od substrátu TMB a od stop-roztoku!

Destičku inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30 minut**.

Odstraňte obsah jamek a jamky čtyřikrát promyjte promývacím puřrem. Ujistěte se, že jamky jsou úplně promyté. Poslední kapky promývacího roztoku opatrně odsajte z povrchu mikrotitrační destičky savým papírem. Nenechte destičku vyschnout.

Pomocí čistých špiček do každé jamky přidejte 100 µl substrátu TMB (**Reagent 4**).

Destičku inkubujte po dobu **10 minut**.

Přidejte do každé jamky 100 µl stop-roztoku (**Reagent 5**). Aby byla reakční doba stejná pro všechny jamky, měl by se do nich stop-roztok přidávat ve stejném pořadí, v jakém jste do nich pipetovali substrát TMB.

OD jamek měřte ELISA readerem s filtrem 450 nm (nebo 450 nm a 630 nm při duální vlnové délce) do 10 minut po přidání stop-roztoku. Žlutá barva roztoku je v temnu stabilní po dobu jedné hodiny.

Výsledky

Naměřené OD standardů vynesete do grafu proti jejich koncentraci a vzniklými body proložte křivku. Z této křivky odečtete hodnoty neznámých vzorků. Přítomnost protilátek proti Aspergillu je dobrým indikátorem reakce hostitele na infekci, ale tyto výsledky musí být vždy vyhodnocovány ve světle dalších klinických informací o každém testovaném pacientovi.

Negativní	0 – 10 U/ml
Šedá zóna	10 – 12 U/ml
Pozitivní	> 12 U/ml

Každá laboratoř by si měla stanovit svůj vlastní normální rozsah koncentrací. Při hodnotách nad 100 U/ml by se měly testy opakovat s vyšším zředěním.

Pozitivní kontrolní vzorek

Cílové hodnoty najdete na certifikátu QC (certifikát zabezpečení jakosti) konkrétní šarže přibaleného k soupravě.

Charakteristiky

Typická standardní křivka

standard	Optická hustota
0,0	0,090
12,5	0,610
25,0	1,002
50,0	1,405
100,0	1,768

Tyto údaje slouží pouze pro ilustraci a nemohou se používat pro určení výsledků vašeho testu. S každou dávkou vzorků je nutno vykreslit novou standardní křivku.

Přesnost

Intra-assay koeficient

jamka	Hodnota	SD	CV%
A	4,6	0,31	6,5
B	16,1	1,18	7,3
C	21,6	0,81	3,7

Inter-assay variační koeficient

Typicky je nižší 12% .

Citlivost

0,17 U/ml

Linearita

přidáno U/ml	změřeno U/ml	obnovení %
10	9,7	97%
20	20,6	103%
40	42,7	106%

Odborná literatura

- Aisner J. a kol., (1977)
Ann Intern Med 86, 539 - 543.
Holmberg, K. a kol., (1980)
J Infect Dis 141(5) 656 - 664
Manso, E. a kol., (1994)
Eur J Clin Mic Infect Dis 13(9) 756 - 760
Latge, J P. a kol., (1994) Infect Immun 62(12) 5424 – 5433
Moser, M a kol., (1994) J Allergy Clin Immunol 93(1) 1 – 11
Knutsen, A P. a kol., (1994) J Allergy Clin Immunol 42(7) 683 – 687
Verweij, P E. a kol., (1995) J Clin Microbiol 33(7) 1912 – 1914
Tomme, J F. a kol., A J Resp Crit Care Med 151 (1) 199 - 204

Shrnutí postupu

- Vzorek předředte 1 : 200 ředicím roztokem (**Reagent 1**).
- Do jednotlivých jamek pipetujte 100 µl standardu, kontroly a vzorků.
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
- Jamky promyjte třikrát.
- Do každé jamky přidejte 100 µl konjugátu (**Reagent 3**).
- Inkubujte při pokojové teplotě po dobu **30** minut.
- Jamky promyjte čtyřikrát.
- 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**).
- Do 10 minut odečtete OD readerem ELISA při 450 nm.



Vyrábí: Genesis Diagnostics Ltd

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

Dodává: LABOSERV s.r.o.

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