

ELI.H.A Aspergillus

Teste serológico de aspergilose por hemaglutinação indireta

102 Testes
(Réf. 44602)



8000110-PT-2025-02
Apenas para diagnóstico *in vitro*, apenas para uso profissional.
Os testes são apenas para uso único.

1 - OBJETIVO
ELI.H.A *Aspergillus* permite a determinação quantitativa de anticorpos séricos contra *Aspergillus fumigatus* por hemaglutinação indireta.
Cada kit permite realizar 102 testes ou 17 reações com 6 diluições.

2 - INTRODUÇÃO
Aspergillus fumigatus é a espécie mais associada a patologias humanas.
A. *fumigatus* tem uma capacidade especial de adaptação parasitária aos seres humanos. No entanto, são necessárias certas condições favoráveis para o seu desenvolvimento:
- condições locais (cavidades pré-formadas, abscessos pulmonares degenerados, membranas mucosas danificadas...);
- condições gerais (imunossupressão após grandes procedimentos cirúrgicos ou médicos: transplante de órgãos, terapia imunossupressora, esteroides, antibióticos...).

3 – PRINCÍPIO DO TESTE
ELI.H.A *Aspergillus* baseia-se no princípio da hemaglutinação indireta. Os glóbulos vermelhos sensibilizados consistem em glóbulos vermelhos de ovelha revestidos com antígeno de *Aspergillus fumigatus*.
A presença de anticorpos séricos específicos leva à aglutinação de eritrócitos sensibilizados, resultando numa camada castanha-avermelhada turva na depressão. Na ausência de anticorpos específicos, os glóbulos vermelhos formam um depósito anular na parte inferior da depressão. Os eritrócitos não sensibilizados garantem a especificidade da reação, portanto, qualquer distúrbio causado por aglutininas naturais anti-ovelha (heteroanticorpos de Forssman, anticorpos infecciosos contra a mononucleose...) pode ser descartado.
A reação é realizada numa placa de microtitulação em forma de U.
O manuseamento é simples e rápido, com resultados em 2 horas.

4 – REAGENTES E MATERIAIS

Descrição	Quantidade
R1: Tubo com 2,2 mL de glóbulos vermelhos sensibilizados	1
R2: Tubo contendo 1 mL de hemácias não sensibilizadas	1
BUF: frasco com 55 mL de solução tampão fosfato, pH 7,2	1
R3: Tubo com 2 mL de adsorvente	1
CONTROLO +: Tubo com 0,2 mL de controlo positivo titulado	1
CONTROLO -: Tubo com 0,2 mL de controlo negativo	1
MICROPLACA: Placas de microtitulação (em forma de U)	2
CONTA-GOTAS: Conta-gotas específico	2

5 – AVISOS E PRECAUÇÕES
- Apenas para diagnóstico *in vitro* e apenas para ser usado por pessoal de laboratório qualificado.
- Cada teste é para utilização unitária.
- Todos os reagentes, exceto o reagente BUF, contêm matérias-primas de origem animal e devem ser manuseados com cuidado.
- As amostras de pacientes são potencialmente infecciosas. Devem ser manuseadas com cautela, respeitando as normas e regulamentos de higiene vigentes para este tipo de produto no país de uso.
- Os reagentes contêm azida de sódio (< 0.1%).
- Não utilizar após o prazo de validade.
- Não use reagentes de lotes diferentes.
- Os reagentes devem ter atingido a temperatura ambiente antes do seu uso.
- Agite suavemente os reagentes **R1** e **R2** antes de usar.
- Quando os reagentes **R1** e **R2** são dispensados, certifique-se de que o conta-gotas está na vertical. Certifique-se de que as gotas estão livres de bolhas de ar, pois só assim é garantido volume constante.

6 – AMOSTRAGEM E MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS
Use soro fresco ou soro armazenado a -20°C que não mostre sinais de hemólise, turbidez ou contaminação.
O congelamento e o descongelamento repetidos devem ser evitados.
Não realize nenhum tratamento de pré-aquecimento (decomposição) do soro.

7 – ESTABILIDADE, ARMAZENAMENTO E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
Os reagentes estão prontos para usar.

Todos os reagentes, armazenados na embalagem original a 2-8°C, serão mantidos estáveis até ao prazo de validade indicado na embalagem. Não congelar.

8 – MATERIAIS NECESSÁRIOS (não incluídos no kit)
- Pipeta(s) automática (s) com volume de pipetagem adaptado ao volume a ser medido;
- Recipientes para resíduos contaminados;
- Centrífuga ;
- Tubos de hemólise.

9 – REALIZAÇÃO DO TESTE
Antes do início do teste, todos os reagentes e amostras devem ter atingido a temperatura ambiente.

9.1 – Preparação da amostra
Realize uma diluição de 1:40 do soro a ser testado:

- 50 µL de soro;
- 1,95 mL do reagente BUF.

9.2 – Realização do teste em microplaca
- Pipete com uma micropipeta multicanal em 8 poços da placa de microtitulação 50 µL BUF.
- Adicionar 50 µL de soro diluído com uma micropipeta ao primeiro poço. Misture o soro com o BUF e faça uma série de diluições, transferindo 50 µL do primeiro poço para o segundo, depois 50 µL do segundo para o terceiro e assim por diante até ao sexto poço. Em seguida, remova 50 µL do sexto poço e descarte. Desta forma, nos poços são obtidas as diluições de 1:80 a 1:2560.
- Pipete 50 µL de soro diluído no sétimo poço. Misture o soro com BUF e descarte 50 µL. Esta diluição de 1:80 representa o controlo do soro e é usada para detetar aglutininas naturais anti-ovelha que podem estar presentes em algumas amostras de soro.
- Agite cuidadosamente **R1** e **R2**.

- Adicione 1 gota de **R1** em cada um dos 6 primeiros poços.
- No sétimo poço, adicione 1 gota de **R2** (controlo sérico).
- Adicione 1 gota de **R1** ao oitavo poço (controlo de reagente). Isso serve para o controlo de precisão dos reagentes BUF e R1.

Nota: Apenas um controlo de reagente deve ser realizado por série de ensaios.

- Homogeneizar cuidadosamente o conteúdo dos poços:

- manualmente, bater na lateral da microplaca que foi colocada horizontalmente sobre a bancada.
- ou, usando um agitador vibratório para placas de microtitulação (por exemplo, a 1300 rpm durante 10s). Não use agitadores com movimentos orbitais.

- Não mova a placa e afaste-a de vibrações.

- Após 2 horas, leia o resultado da reação.

9.3 – Adsorção de aglutininas naturais anti-ovelha em caso de aglutinação de soro controlo
- **R3** - Agitar suavemente o reagente.
- Coloque o seguinte num tubo e misture:

- 0,1 mL de soro
- 0,3 mL de **R3**

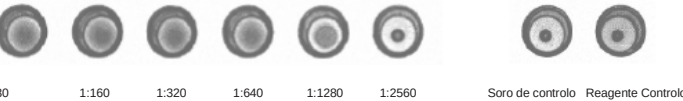
- Misturar e incubar por 60 minutos à temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2000 rpm por 15 minutos.
- Recolha o sobrenadante líquido; o soro está agora diluído a 1:4.
- Realize uma diluição de 1:10 do sobrenadante no reagente BUF para obter uma diluição do adsorvido (1:40).
- Siga as etapas descritas em "Realização do teste em microplaca", mas substitua a diluição de reserva pela diluição da reserva adsorvida.

10 – OBSERVAÇÃO / LEITURA DA REAÇÃO
Reação negativa: Ausência de hemaglutinação.

Na parte inferior do poço, pode ver um anel mais ou menos largo.

Reação positiva: Presença de hemaglutinação.
Presença de uma camada castanha avermelhada na parte inferior do poço; às vezes, também é visível um anel fino periférico.

Exemplo de hemaglutinação obtida com um soro 1:1280 positivo:



11 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Título < 1:320: Reação não significativa.
Provavelmente não há aspergilose invasiva.
Repita o teste após 2 a 3 semanas e realize eletroforese em contracorrente ou imunoeletroforese.

Título = 1:320: Reação ambígua.
Repetir o teste após 2 a 3 semanas e realizar eletroforese em contracorrente ou imunoeletroforese

Título ≥ 1:640: Resposta significativa que indica aspergilose invasiva.

12 – CONTROLO INTERNO DE QUALIDADE
CONTROLO + e **CONTROLO -** devem ser tratados como amostras de pacientes. O título do **CONTROLO +** deve corresponder ao título impresso no rótulo do frasco ± uma diluição. Não deve existir hemaglutinação do **CONTROLO -**. Se houver hemaglutinação, o teste é inválido.

13 – CAUSAS DOS ERROS E LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- Má preservação do soro.
- Má preservação dos reagentes após a abertura.
- Use apenas o conta-gotas incluído no kit.
- Os conta-gotas não devem ser trocados entre os reagentes **R1** e **R2**.
- Em caso de reação positiva nos primeiros 6 poços, outra série de diluições será realizada para determinar o limite do título de hemaglutinação.
- O controlo do soro deve mostrar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controlo, o teste deve ser repetido após as aglutininas naturais contra ovinos terem sido removidas do soro por adsorção.
- O controlo do reagente deve mostrar uma reação negativa (anel). Em caso de hemaglutinação deste controlo, o *Aspergillus ELI.H.A* não pode ser usado.
- Alguns soros, com concentração de anticorpos muito alta, pode causar um fenómeno de zona (com o desaparecimento da turbidez nas primeiras diluições), que desaparece novamente nas diluições subsequentes.
- A qualidade dos reagentes permite que a reação seja realizada à noite e o teste seja lido na manhã seguinte, desde que a placa de microtitulação não se mova de forma alguma e esteja protegida de choques.
- Em todos os casos, os dados clínicos, epidemiológicos e biológicos devem ser totalmente levados em consideração antes de estabelecer o diagnóstico final.

14 - EFICÁCIA
ELI.H.A *Aspergillus* é composto por hemácias sensibilizadas ao antígeno *Aspergillus fumigatus*, o que garante a especificidade e sensibilidade da reação de hemaglutinação indireta.
Os resultados das avaliações dos testes mostram uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 98%.

15 – ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS
Os resíduos devem ser eliminados no país de utilização de acordo com as regras e normas de higiene aplicáveis a este tipo de produto.
Se o reagente BUF derramar, limpe a área de trabalho com papel absorvente e enxague com água.
Se o soro ou outro reagente for derramado na área de trabalho, limpe-o com lixívia e papel absorvente.

16 – LITERATURA

1. J. CAPDEVILLE, S. FIABANE - Diagnostic immunologique des aspergilloses - *Le Pharmacien Biologiste*, Volume XII, N° 121, 205-249.
2. B. pesson, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie *Le Pharmacien Biologiste*, Tomo 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'hemagglutination indirecte dans le diagnos précoce de l'aspergillose - *Bulletin de la Société de Mycologie Médicale*, 1974, Tomo III, N° 1, 45-48.
5. J.-M. SENET, R. ROBERT – Intérêt de l'hemagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmosis et à l'aspergillose - *Archives Médicales de l'Ouest*, 1979, Tomo 11, N° 1, 39-42.
6. A. CULINO, M. MIEGEVILLE, O.MORIN – Apports de l'hemagglutination indirecte dans le diagnostic de l'aspergilose pulmonaire – *Feuilles de Biologie*, 1984, Vol. XXV, N°137, 51/57.
7. M. MIEGEVILLE, O. MORIN, C. VERMEIL - Etude sérologique rétrospective concernant une série d'aspergillose chez des malades à "hauts risques" - *Feuilles de Biologie*, 1986, Vol. XXVII, No. 148, 37-39.
8. 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 – *Feuilles de Biologie*, 1989, Vol. XXX, No.169, 31-34.

As alterações em relação à versão anterior são destacadas em cinzento.

