

Serodijagnoza aspergiloze indirektnom hemaglutinacijom

CE

Samo za *in vitro* dijagnostiku, isključivo za profesionalnu uporabu.
Testovi su samo za jednokratnu uporabu.

ELI.H.A *Aspergillus* omogućava kvalitativno utvrđivanje antitela anti-*Aspergillus fumigatus* serumima indirektnom hemaglutinacijom.
Svaki kit omogućava da se uradi 102 testa ili 17 reakcija od 6 razblaženja.

Aspergillus fumigatus je vrsta koja se najčešće susreće u humanoj patologiji. *A. fumigatus* poseduje posebnu sposobnost da se prilagodi kao parazit u čoveku.

Međutim, za njegov razvoj su potrebni određeni optimalni uslovi:

- lokalni uslovi (stvorene šupljine, postojeći plućni apcesi, oštećene membrane sluzokože, itd.)
- opšti uslovi (imunosupresija posle ozbiljnih operacija ili medicinskih zahvata: transplantacija organa, imunosupresivna terapija, steroidi, antibiotici, itd.)

ELI.H.A. Aspergillus se zasniva na principu indirektno hemaglutinacije. Senzibilizirana crvena krvna zrnca sastoj se od crvenih krvnih zrnaca obojena prekrivenih antigenom *aspergillus fumigatus*-a. Prisustvo specifičnih antitela serumu dovodi do aglutinacije senzibiliziranih crvenih krvnih zrnca čiji je rezultat mutan crveno-smeđ talog koji prekriva polje. Kada specifična antitela nisu prisutna, crvena krvna zrnca stvaraju prstenasti talog na dnu polja.

Nesenzibilizirana crvena krvna zrnca obezbeđuju specifičnost reakcije što omogućava eliminaciju svakog uticaja prirodnih anti-aglutinosa (Forsmanova heteroantitela, antitela infektivne mononukleozitne, itd.). Reakcija se vrši na U-mikroplodici.

Kuvanje je jednostavno i brzo a rezultati se dobijaju u roku od 2 sata.

Opis	Količina
R1: Bočica sa 2,2 mL senzibilisanih crvenih krvnih zrnaca	1
R2 : Bočica sa 1 mL nesenzibilisanih crvenih krvnih zrnaca	1
BUF: Bočica sa 55 mL fosfatnog pufera pH 7,2	1
R3 : Bočica sa 2 mL adsorbenta	1
CONTROL +: Bočica sa 0,2 mL titiranog pozitivnog kontrolnog reagensa	1
CONTROL -: Bočica sa 0,2 mL negativnog kontrolnog reagensa	1
MICROPLATE: Mikropločica sa poljima koja imaju U-dno	2
DROPPER: Specijalna kapaljka	2

- Reagensi su predviđeni da se koriste samo za *in vitro* dijagnostiku i sa njima mora da rukuje ovlašćeno osoblje.
- Testovi su za jednokratnu upotrebu.
- Svi reagensi, osim reagensa **BUF**, sadrže sirovine životinjskog porekla i sa njima mora da se postupa oprezno.
- Uzorci su potencijalno zarazni. Njima se mora rukovati uz uobičajene mere predostrožnosti uz poštovanje higijenskih pravila i propisa koji su na snazi u zemlji u kojoj se koristi.
- **Reagensi sadrže natrijum azid (< 0.1%).**
- Ne koristite reagentse kojima je istekao rok važnosti.
- Ne koristite reagentse sa različitim brojevima partija.
- Pre upotrebe pustite da serum i reagensi postignu sobnu temperaturu.
- Pre upotrebe pažljivo promućkajte reagentse **R1** i **R2**.
- Kada dozirate reagentse **R1** i **R2** proverite da li kapalica stoji potpuno vertikalno. Proverite da u kapima nema mehurića vazduha da li bezbednosti konstantan volumen doziranja.

Koristite sveže serum ili serum koji je čuvan na -20°C i ne pokazuje nikakve znake hemolize, zamućenosti ili kontaminacije.

Izbegavajte ponovno zamrzavanje i odmrzavanje.

Nemojte dekomplementirati serum.

Svi reagensi koji se čuvaju u svom originalnom pakovanju na temperaturi od 2-8°C su stabilni sve do datuma isteka roka trajanja koji je naveden na kutiji. Ne zamrzavajte.

- Automatska pipeta sa volumenom doziranja prilagođenim volumenu koji će se meriti;
- Posude za odlaganje kontaminiranog otpada;
- Centrifuga;
- Epruvete za hemolizu.

- Razblažite serum koji treba da se testira u razmeri 1:40:
 - 50 µL seruma
 - 1,95 mL **BUF** reagensa.

- Mikrokanalnom pipetom dodajte 50 μ L seruma u 1. polje.
Izmešajte serum sa **BUF** reagensom i izvršite serijsko razblaživanje, po mogućstvu koristeći mikrodiluter, tako što ćete 50 μ L iz 1. polja prebaciti u 2. polje, zatim 50 μ L iz 2. polja u 3. polje i tako sve dok ne završite sa 6. poljem. Zatim se iz 6. polja uzima i baca 50 μ L.
Na ovaj način dobijaju se razblaženja od 1:80 do 1:2560.

- Dodajte 50 µl razblaženog seruma u 7. polje.
Pomešajte serum sa **BUF** reagensom a zatim uzmite i bacite 50 µL.
Ovo razblaženje (1:80) je kontrola seruma čija je uloga da otkrije prirodne anti-aglutinine ovce koje bi mogli da budu prisutni u određenim uzorcima seruma.

- Dodajte po 1 kap reagensa **R1** u prvih 6 polja.
- Dodajte 1 kap reagensa **R2** u 7. polje (kontrola seruma).
- Dodajte 1 kap reagensa **R1** u 8. polje (kontrola reagensa) čija je uloga da kontroliše validnost reagensa **BUF** i **R1**.

Veoma pažljivo promućkajte sadržaj u poljima:

- ili ručno tako što ćete lateralno lupkati bočnu stranu mikropločice koja je postavljena na ravan radni sto
- ili pomoću vibratora sa vibracionom pločom za mikropločice (na primer 10 sekunda na 1300 o/min). Ne koristite orbitalni vibrator.

- Sada ostavite pločicu da odleži daleko od svakog izvora vibracija.
- Pločica može da se očita posle 2 sata.

- Pažljivo promuckajte reagens **R3**.
- U epruvetu stavite i izmešajte:
 - 0,1 mL seruma
 - 0,3 mL reagensa **R3**.
- Inkubirajte na sobnoj temperaturi 60 minuta.
- Centrifugirajte 15 minuta na 2000 o/min.
- Sakupite supernatant; serum je sada u razblaženju 1:4.
- Izvršite razblaživanje supernatanta u **BUF** reagensu u razmeri 1:10 da dobijete razblaženi adsorbovani materijal (1:40).
- Izvršite radnje opisane u "Izvođenju testa na mikroplodici", ali razblaženi materijal zamenite razblaženim adsorbovanim materijalom.

Negativna reakcija:	Odsustvo hemaglutinacije.
Pozitivna reakcija:	Prisustvo hemaglutinacije. Prisustvo više-manje velikog prstena na dnu polja. Prisustvo mutnog crveno-smeđeg taloga koji prekriva dno; ponekad je prisutna fina obodna ivica.

Titir < 1:320: **Reakcija koja nije značajna.**
Verovatno odsustvo intenzivne infekcije aspergillusom.
Ponoviti test posle 2 do 3 nedelje i takođe uraditi test elektrosinereze ili imunoefektrofereze.

Titir = 1:320: Sumnjiva reakcija.
Ponoviti test posle 2 do 3 nedelje i takođe uraditi test elektrosinereze ili imunoelktroforeze.

Titar $\geq 1:640$: Značajna reakcija koja potvrđuje duboku infekciju aspergilusom.

- Loše čuvanje serumu.
- Loše čuvanje reagensa posle prvog otvaranja.
- Koriste se isključivo one kapaljke koje se nalaze u kitu.
- Ne koristiti istu kapaljku i za reagens R1 i za R2.
- U slučaju pozitivne reakcije u prvih 6 polja, izvršiti dalje serijsko razblaživanje da bi se odredila granična vrednost titra hemaglutinacije.
- Kontrola serumu mora da da negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole biće neophodno ponoviti test pošto se iz serumu adsorpcijom odstrane prirodni anti-aglutinini ovce.
- Kontrola reagensa mora da da negativnu reakciju (prsten). U slučaju hemaglutinacije ove kontrole, **ELI.H.A Aspergillus** ne može da se koristi.
- Određeni serumu sa visokom koncentracijom antitela mogu da daju povod za fenomenom zone (sa nestajanjem zamućenja) u početnim razblaženjima koji iščezava u kasnijim razblaženjima.
- Kvalitet reagensa omogućava da se reakcija izvrši uveće a očitavanje titra sledećeg jutra pod uslovom da se mikroploška nikako ne pomeri i da bude zaštićena od bilo kog izvora vibracija.
- U svim slučajevima, neophodno je da se pre utvrđivanja konačne dijagnoze u potpunosti uzmu u obzir klinički, epidemiološki i biološki podaci.

ELI.H.A *Aspergillus* se sastoji od crvenih krvnih zrnaca senzibilisanih antigenom *Aspergillus fumigatus*-a koji obezbeđuje specifičnost i senzitivitet indirektno hemagulacione reakcije. Procena je pokazala da ovaj test ima osetljivost od 80% i specifičnost of 98%.

Otpad treba da se odloži u skladu sa sanitarnim pravilnicima i propisima koji važe za ovu vrstu proizvoda u zemlji u kojoj se koriste.

Ukoliko se **BUF** reagens prospe, očistiti radnu površinu upijajućim papirom i isprati vodom.

Ukoliko se na radnu površinu prospe serum ili neki drugi reagens, očistiti izbeljivačem i upijajućim papirom.

1. J. CAPEVILLE, 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. BRISETT - 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'aspergillrose - *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'aspergillrose - *Archives Médicales de l'Ouest*, 1979, Tome 11, N° 1, 39-42.
6. A. CULINO, M. MIEGIVILLE, O. MORIN - Apports de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic de l'aspergillrose pulmonaire - *Feuilles de Biologie*, 1984, Vol. XXV, N° 137, 51/57.
7. M. MIEGIVILLE, O. MORIN, C. VERMEIL - Etude sérologique rétrospective concernant une série d'aspergillrose chez des malades à "hauts risques" - *Feuilles de Biologie*, 1986, Vol. XXVII, N° 148, 37-39.
8. M.-C. GBADAMASSI, C. CIVADIER, T. SANDRE, T.-H. DUONG, C. COMBESCOT - Diagnostic immunologique de l'aspergillrose : Proposition de l'association de deux techniques facilement mises en œuvre au laboratoire - *Feuilles de Biologie*, 1989, Vol. XXX, N° 169, 31-34.

Izvršene promjene Verzije u odnosu na prethodnu verziju su istaknute u sivoj boji.

ELITech MICROBIO
Parc d'activités du Plateau
Allée d'Athènes
83870 SIGNES
FRANCE
☎: 33 (0)4 94 88 55 00
<http://www.elitechgroup.com>

