

ELI.H.A Aspergillus

Serodijagnoza aspergiloze indirektnom hemaglutinacijom

102 testa
(Ref. 44602)

8000110-SR-2025-07
Samo za *in vitro* dijagnostiku, isključivo za profesionalnu uporabu
Testovi su samo za jednokratnu uporabu.



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

2 – UVOD
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.).

3 – PRINCIP
ELI.H.A Aspergillus se zasniva na principu indirektno hemaglutinacije. Senzibilisana crvena krvna zrnca sastoje se od crvenih krvnih zrnaca ovcu prekrivenih antigenom *aspergillus fumigatus*-a. Prisustvo specifičnih antitela serumu dovodi do aglutinacije senzibilisanih crvenih krvnih zrnaca čiji je rezultat mutan crveno-smeđ talog koji prekriva polje. Kada specifična antitela nisu prisutna, crvena krvna zrnca stvaraju prstenasti talog na dnu polja.
Nesenzibilisana crvena krvna zrnca obezbeđuju specifičnost reakcije što omogućava eliminaciju svakog uticaja prirodnih anti-aglutitina ovcu (Forsmanova heteroantitela, antitela infektivne mononukleoze, itd.). Reakcija se vrši u U-mikropločici.
Rukovanje je jednostavno i brzo a rezultati se dobijaju u roku od 2 sata.

4 – REAGENSI I MATERIJAL

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 titriranog 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

5 – MERE PREDOSTROŽNOSTI

- 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 postupiti 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 koriste.
- Reagensi sadrže natrijum azid (koncentracija < 0.1%). Natrijum azid koji se nalazi u reagensima može reagovati sa teškim metalima u cevima i formirati eksplozivna jedinjenja. Stoga se preporučuje da se reagensi ne bacaju u sudoperu i da se poštuju važeće preporuke i propisi za odlaganje otpada.
- Ne koristite reagense kojima je istekao rok važnosti.
- Ne koristite reagense sa različitim brojevima partija.
- Pre upotrebe pustite da serum i reagensi postignu sobnu temperaturu.
- Pre upotrebe pažljivo promućkajte reagense **R1** i **R2**.
- Kada dozirate reagense **R1** i **R2** proverite da li kapalica stoji potpuno vertikalno. Proverite da u kapima nema mehurića vazduha da bi obezbedili konstantan volumen doziranja.

6 – SAKUPLJANJE I OBRADA UZORKA
Koristite svež 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.

7 – STABILNOST, ČUVANJE I PRIPREMANJE REAGENSA
Reagensi su spremni za upotrebu.
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.

8 – MATERIJAL KOJI JE POTREBAN ALI SE NE ISPORUČUJE UZ KIT

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

9 – NAČIN RADA
Pre upotrebe pustite reagense da dobiju sobnu temperaturu.

9.1 – Priprema uzorka

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

9.2 – Izvođenje testa na mikropločici

- Pomoću mikrokanalne pipete stavite 50 µL **BUF** reagensa u 8 polja mikropločice.

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

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

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

Napomena: Za svaku seriju testova radite samo jednu kontrolu reagensa.

- Veoma pažljivo promućkajte sadržaj u poljima:
 - ili ručno tako što ćete lateralno lupkati bočnu stranu mikropločice koja je stavljena na ravan radni sto
 - ili pomoću vibratora sa vibracionom pločom za mikropločice (na primer 10 sekundi 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.

9.3 – Adsorpcija prirodnih anti-aglutinina ovcu u slučaju aglutinacije kontrole serumu

- Pažljivo promućkajte reagens **R3**.
- U epruvetu stavite i izmešajte:
 - 0,1 mL serum
 - 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 supematanta u **BUF** reagensu u razmeri 1:10 da dobijete razblaženi adsorbovani materijal (1:40).
- Izvršite radnje opisane u «Izvođenje testa na mikropločici», ali razblaženi materijal zamenite razblaženim adsorbovanim materijalom.

10 – OČITAVANJE

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

Primer: Serum pozitivan u razblaženju 1:1280.



11 – TUMAČENJE REZULTATA

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

Titar = 1:320: **Sumnjiva reakcija.**
Ponoviti test posle 2 do 3 nedelje i takođe uraditi test elektrosinereze ili imunoelektroforeze.

Titar ≥ 1:640: **Značajna reakcija koja potvrđuje duboku infekciju aspergilusom.**

12 – INTERNA KONTROLA KVALITETA
Reagensi **CONTROL +** i **CONTROL –** moraju da se tretiraju kao test serum. Titar reagensa **CONTROL +** mora da bude isti kao titar odštampan na etiketi bočice +/- jedno razblaženje. Kod reagensa **CONTROL –** ne sme da bude nikakve hemaglutinacije. Ukoliko je hemaglutinacija prisutna, test nije validan.

13 – UZROCI GREŠKE I OGRANIČENJA TESTA

- 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 ovcu.
- 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 fenomen zone (sa nestajanjem zamućenja) u početnim razblaženjima koji iščezava u kasnijim razblaženjima.
- Kvalitet reagensa omogućava da se reakcija izvrši uveče a očitavanje testa sledećeg jutra pod uslovom da se mikropločica 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.

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

15 – ODLAGANJE OTPADA
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.

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 chez des malades à "hauts risques" - *Feuillets 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'aspergillose : Proposition de l'association de deux techniques facilement mises en oeuvre au laboratoire - *Feuillets 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

