

Súprava ELISA-anti-CANDIDA-II-A,G je určená na stanovenie špecifických protilátok triedy IgA a IgG proti manávnym a glukánovým sekvenciám bunkovej steny *Candida albicans* v ľudskom sére. Umožňuje stanovenie 18 neznámych vzoriek v duplikátoch pre triedu IgA a IgG. Mykotické infekcie v súčasnosti patria k najrozšírenejším nákazám populácie. Druhy rodu *Candida* ako napr. *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.dubliniensis* a i. sú fakultatívne patogény spôsobujúce oportúnne infekcie u imunokompromitovaných osôb /HIV+, postransplantačné stavy, malignity, atd./ Zástupcovia rodu *Candida* sú príčinou 79-85% nozokomiálnych mykóz a odhady úmrtnosti sú medzi 50-60%. Kandidóza sa manifestuje prevažne v jednej z dvoch foriem: mukokutánna/superficiálna alebo hematogénne diseminovaná kandidóza. U zdravých osôb *C. albicans* predstavuje saprofytickú flóru gastrointestinálneho a vulvovaginálneho traktu a orofarynxu. *C.albicans* je príčinou kandidózy až u 67% imunokompromitovaných jedincov, pričom mortalita v prípade systémového postihnutia je 30-40%.

PRINCÍP

Stanovenie je založené na princípe nepriamej ELISA metódy na detekciu špecifických protilátok. Antigén manan a glukán, izolovaný z *C. albicans* je imobilizovaný na povrchu jamiek mikrotitračnej doštičky. Testované vzorky nariedeného ľudského séra sa inkubujú v jamkách mikrotitračnej doštičky. V tejto fáze dochádza k naviazaniu špecifických protilátok z ľudského séra na imobilizovaný antigén. Po inkubácii sa premytím odstráni nezreagované komponenty ľudského séra a pridá sa konjugát chrenovej peroxidázy s protilátkou proti ľudskému imunoglobulínu IgA, resp. IgG. Po inkubácii a odstránení prebytočného konjugátu sa pridá substrát TMB a enzymová reakcia sa zastaví pridaním kyseliny sírovej. Absorbancia testovaných vzoriek sa porovnáva s absorbanciou štandardov. Intenzita sfarbenia je úmerná množstvu špecifických protilátok prítomných v sére.

ZLOŽENIE

1. Mikrotitračná doštička

12 ks 8-jamkových lámateľných stripov aktivovaných antigénom.

2. Štandardy

12 fľaštičiek, 6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky IgA a 6 fľaštičiek (6 x 1 ml) s roztokmi špecifickej protilátky IgG proti *C. albicans* s koncentráciou 0 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 U.ml⁻¹. Štandardy sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie.

3. Kontrolné vzorky

4 fľaštičky, 2 fľaštičky (2 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou a pozitívnou pre triedu IgA a 2 fľaštičky (2 x 1 ml) s kontrolnou vzorkou negatívnou a pozitívnou pre triedu IgG, sú vyriedené v zriedovacom roztoku, pripravené na použitie. Koncentrácie kontrolných vzoriek sú uvedené v Osvedčení o súprave.

4. Substrát TMB

1 fľaštička (12 ml) s TMB (3,3',5,5'- tetrametylbenzidín). Je pripravený na použitie.

5. Zriedovací roztok

2 fľaštičky (2 x 50 ml) s TRIS-HCl tlmovým roztokom s obsahom bovinného sérového albumínu, 0,2% azidu sodného, 0,02% timerosalu a modrého farbiva, pH 7,0 ± 0,2. Je pripravený na použitie.

6. Vymývací roztok

1 fľaštička (50 ml). Obsah fľaštičky s vymývacím roztokom doplňte do 1000 ml destilovanou vodou.

7. Konjugáty

2 fľaštičky (2x8 ml) s konjugátmi HRP-anti-IgA a HRP-anti-IgG. Sú pripravené na použitie.

8. Kyselina sírová

1 fľaštička (8 ml) s roztokom 0,5 mol.l⁻¹ kyseliny sírovej. Je pripravený na použitie.

PRÍPRAVA VZORIEK

Súprava je určená na stanovenie vzoriek krvného séra. Čerstvé vzorky sa v priebehu stanovenia uskladňujú do 72 hodín pri 2-8 °C. Vzorky séra sa dlhodobo uskladňujú pri -20°C. Tieto po rozmrazení viackrát nezamrazujte. Na stanovenie nepoužívajte lipemické, hemolyzované alebo kontaminované krvné séra. Pacientske séra sa riedia 100-krát, t.j. 10 µl séra sa zriedi prídavkom 1 ml zriedovacieho roztoku.

DOPORUČENIE PRE PRÁCU SO SÚPRAVOU

- Všetky reagenty musia byť pred začiatkom stanovenia vyteperované na laboratórnu teplotu.
- Všetky inkubácie sa robia pri laboratórnej teplote 18 - 25°C.
- Odporúčame, aby sa štandardy a pacientske séra spracovali v duplikátoch.
- Pracujte s presnými pipetami.
- Zabráňte mechanickému poškodeniu stripov.
- Nepoužité stripy uchovávajte v obale spolu s vysušovadlom.
- Po ukončení premývania je dôležité dôkladne odstrániť vymývací roztok zo stripov.

PRACOVNÝ POSTUP

1. Pipetujte do jamiek stripov:
 - po 20 µl štandardov
 - po 20 µl negatívnej kontrolnej vzorky
 - po 20 µl pozitívnej kontrolnej vzorky
 - po 20 µl pacientskych zriedených vzoriek
 - po 100 µl zriedovacieho roztoku do každej jamky
2. Inkubujte 30 minút pri laboratórnej teplote.
3. Po ukončení inkubácie stripy 4x premyte vymývacím roztokom, pripraveným podľa návodu.

Poznámka: Pokiaľ nie je k dispozícii špeciálna premývačka pre mikrotitračné doštičky, premývanie spočíva v napipetovaní cca. 250 µl vymývacieho roztoku do všetkých použitých jamiek. Po 30 sekundách sa vymývaci roztok zo stripov prudko vyleje. Postup sa opakuje ešte 3x.

4. Po ukončení premývania mikrotitračnú doštičku otočte hore dnom a okraje osušte filtračným papierom.
5. Do jamiek napipetujte po 100 µl konjugátu HRP-anti-IgA, resp. HRP-anti-IgG a inkubujte pri laboratórnej teplote 30 minút.
6. Stripy znova 4x premyte vymývacím roztokom a osušte podľa bodu 4.
7. Do jamiek napipetujte bez prerušenia po 100 µl substrátu TMB. Pipetovanie musí byť ukončené do 2 minút!
8. Vyfarbuje sa 30 min v tme.
9. Reakcia sa zastaví pridaním 50 µl kyseliny sírovej do každej jamky.
10. Intenzitu sfarbenia merajte na fotometrickom čítači mikrotitračných doštičiek pri vlnovej dĺžke 450 nm. Ako referenčný filter môže byť použitý filter s vlnovou dĺžkou od 600 – 690 nm. Meranie ukončíte najneskôr do 1 hod po skončení vyvíjania. Doštičku medzitým uschovajte v tme.

INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

- Keď nie je k dispozícii program na zostrojenie kalibračnej závislosti, použite nasledovný postup.
- Vypočítajte priemerné absorbancie pre každý štandard a patientske vzorky.
- Nakreslite štandardnú krivku na semilogaritmický papier vynesení logaritmu koncentrácií štandardov ($U \cdot ml^{-1}$) na horizontálnu (x) os proti priemerným absorbanciam štandardov na vertikálnu (y) os.
- Z krivky odčítajte hodnotu koncentrácií patientskych vzoriek. Táto hodnota sa už nenásobí riediacim faktorom.

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Očakávané hodnoty u zdravej populácie sú negatívne. Každé laboratórium by si malo stanoviť vlastné rozpätie normálnych hodnôt na základe klinicky charakterizovaných vzoriek.

Odporúčame nasledovné hodnotenie:

Hodnotenie výsledkov	protlátky IgA	protlátky IgG
Negatívne hodnoty	< 10 $U \cdot ml^{-1}$	< 15 $U \cdot ml^{-1}$
Hraničná hodnota	10 - 15 $U \cdot ml^{-1}$	15 - 21 $U \cdot ml^{-1}$
Pozitívne hodnoty	> 15 $U \cdot ml^{-1}$	> 21 $U \cdot ml^{-1}$

KONTROLA KVALITY STANOVENIA

- Absorbancia nulového štandardu by mala byť menej ako 0,2.
- Absorbancia najvyššieho štandardu by mala byť viac ako 0,8.
- Hodnoty koncentrácií negatívnej a pozitívnej kontrolnej vzorky sa musia pohybovať v intervale koncentrácií uvedenom v Osvedčení o súprave.

CHARAKTERISTIKA STANOVENIA

Štandardizácia

Štandardy v súprave ELISA-anti-CANDIDA-II-A,G sú kalibrované proti internému referenčnému štandardu.

Merací rozsah

6,25-100 $U \cdot ml^{-1}$

Citlivosť

Detekčný limit súpravy je 5 $U \cdot ml^{-1}$.

Špecifická

Súpravou stanovujeme protilátky triedy IgA a IgG proti *Candida albicans*.

Recovery

Metódou štandardného prídavku sa získajú hodnoty 80 -120%.

UPOZORNENIE

- Súprava je určená pre profesionálne in vitro použitie v laboratóriu.
- V prípade výskytu nežiaducich príhod, tieto hláste na č. tel. +421 55 6228 131, biogema4@stonline.sk
- Jednotlivé substancie súpravy obsahujú konzervačné činidlá azid sodný a timerosal. Azid sodný reaguje s olovom a meďou za vzniku výbušných azidov. Azid sodný a timerosal môžu pri priamom kontakte s pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade kontaktu s pokožkou postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Kyselina sírová, v koncentrácii 0,5 mol.l⁻¹, môže pri priamom kontakte s očami alebo pokožkou spôsobiť podráždenie. V prípade zasiahnutia očí alebo kože postihnuté miesto vymyte veľkým množstvom vody.
- Azid sodný, timerosal a kyselina sírová v koncentraciách, ktoré sú použité v súprave, sú zdraviu škodlivé. Vzhľadom k nízkemu obsahu škodlivých látok v substanciach súpravy životné prostredie nie je ohrozené.
- Štandardy obsahujú ľudské sérum. Ľudské sérum použité na prípravu týchto substancií vykazovalo negatívnu reakciu na prítomnosť antigénu HBsAg, HIV 1, HIV 2 a HCV. Žiadna metóda stanovenia však nie je schopná dať stopercentnú istotu, preto so substanciami obsahujúcimi ľudské sérum pracujte ako s infekčným materiálom, pri práci používajte rukavice.
- Výrobca ručí za výsledky dosiahnuté súpravou ELISA-anti-CANDIDA-II-A,G len v prípade dodržiavania návodu a skladovacích podmienok.

LIKVIDÁCIA ODPADU

Nepoužité zvyšky patientskych vzoriek a substancie obsahujúce ľudské sérum likvidujte ako infekčný materiál, ostatný materiál a nepoužité zvyšky súpravy obsahujúce nebezpečné chemické látky odporúčame tiež zabezpečiť v súlade s ustanoveniami zákona NR SR č. 223/2001 Z.z. a vyhlášky MŽP SR č. 284/2001 Z.z.

SKLADOVANIE A STABILITA

Súpravu skladujte pri 2 - 8 °C. Doba expirácie súpravy je 12 mesiacov odo dňa výroby, ak sú substancie v pôvodnom stave. Neodporúčame kombinovať substancie viacerých šarží.

LITERATÚRA:

Buchvald,J.: Mykotické infekcie–aktuálny medicínsky problém. Medicínsky monitor 1/1995, 13-15

Faux,J.,A.: 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, 1992, 153, 167-172

Jones,J.M.: Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis. Clin. Microbiol. Rev.: 1990, 3,(1), 32-45

Kondori,N., Edebo,L., Mattsby-Baltzer,I.: Circulating β (1-3) glucan and immunoglobulin G subclass antibodies to *Candida albicans*

cell wall antigens in patients with systemic candidiasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2004, 11, 344-350

Kumar,C.P.G., Menon,T., Rohini,P.S., Rajasekaran,S., Sundararajan,T., Venkatesikal, M.: Anti-Candida antibodies and candidemia in ninety patients with HIV/AIDS and cancer. Journal de Mycologie Médicale /Journal of Medical Mycology. 2007, 17, (1), 50-53

Višňovská,D., Buchvald,J.: Štúdia o šírení zoonotropónznej mikrospórie (*Microsporum canis*) z mačiek na ľudí. Slov. Lek., 1993, 5-6, 37-39

White,L.P., Archer,A.E., Barnes,R.A.: Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infection, with an emphasis on invasive candida infection. J. Clin. Microbiol. 2005, 43,(5), 2181-2187

