

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus aspergilozei nustatyti

96 individualūs testai



Naudojimo instrukcija produktui N° 6100

EC reg. N°: CH-201301-0006

Naudojimo paskirtis:

Serologinei aspergilozės diagnozei (IgG).

Tolimesniems pacientų tyrimams, kuriems įtariama aspergiliozės infekcija.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) šulinėliams, kurių sienelės padengtos šiais mišiniais:

- Tirpiaisiais somatiniais ir medžiagų apykaitos *Aspergillus fumigatus* antigenais
- Rekombinantiniais antigenais: dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsin) ir ribonuclease (mitogillin) nuo *Aspergillus fumigatus*

Specifinių parazitinių serumo antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A – alkalino fosfatazės konjugatu. Šulinėliai, kurių sienelės padengtos antigenais, yra laužomose juostelėse, t.y. kai reikia atlikti nedidelį kiekį testų, juostelės gali būti laužomos po 1 šulinėlį.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

| | | | | |
|--------------------|---------|--|-----|------------|
| WELL | 6100-01 | Laužomos ELISA juostelės su <i>Aspergillus fumigatus</i> antigenais | 96 | šulinėliai |
| DILB | 6100-02 | Koncentruotas skiedimo buferis (10 x) | 50 | ml |
| WASH | 6100-03 | Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x) | 50 | ml |
| ENZB | 6100-04 | Fermento buferis | 50 | ml |
| STOP | 6100-05 | Stabdomasis tirpalas (K ₃ PO ₄) | 25 | ml |
| CONTROL - | 6100-06 | Neigiamas kontrolinis serumas | 200 | µl |
| CONTROL -/+ | 6100-07 | Silpnai teigiamas serumas (ribinė kontrolė) | 200 | µl |
| CONTROL + | 6100-08 | Teigiamas kontrolinis serumas | 200 | µl |
| CONJ | 6100-09 | Baltymo A – alkalino fosfatazės konjugatas | 300 | µl |
| SUBS | 6100-10 | Fosfatazės substratas | 20 | tablečių |
| | | Multipipetės rezervuaras, 25 ml | 1 | vienetas |
| | | Rémelis – ELISA 8-šulinėlių laikikliams | 1 | vienetas |

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°- 8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje). Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutės šono.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai serumų skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami šulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm).

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

ELISA šulinėliai: atidaryti folinio maišelio 6100-01 šoną ir paimti reikalingą skaičių šulinėlių. Įdėti paruoštus šulinėlius į 8-šulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tuščias laikiklio vietas jau panaudotais šulinėliais. Įdėti šulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Iš naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 6100-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10.

Plovimo tirpalas: praskiesti koncentruotą plovimo tirpalą (10 x) 6100-03 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Galite naudoti savo plovimo tirpalą. Nenaudoti buferio, kuriame būtų fosfato, kuris gali inhibuoti fermentinį alkalino fosfatazės aktyvumą.

Neigiamas, silpnai teigiamas (ribinis) ir teigiamas **kontroliniai serumai:** praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 6100-06 – 6100-08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20).

Tiriamas serumas: praskiesti 10 µl serumo su 2,0 ml skiedimo buferio tirpalo (galutinis skiedimas 1/201).

Baltymo A - alkalino fosfatazės **konjugatas:** praskiesti konjugatą 6100-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/51).

Substrato tirpalas: atšildyti fermento buferį 6100-04 iki kambario temperatūros. Prieš substrato įdėjimą į ELISA šulinėlius, ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 6100-10 nepraskiestame buferyje 6100-04 (1 tabletė į 2,5 ml buferio). Maišyti tol, kol tabletė(ės) visiškai ištirps.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 6100-05 naudoti neskiestą.



Įspėjimai ir atsargumo priemonės: Tirpalai 6100-02, 6100-03, 6100-04 ir 6100-09 turi atitinkamai 0,1%, 0,05%, 0,01% ir 0,1% natrio azido (N_aN_3). Tirpalas 6100-02 turi 0,02% mertiolato. Šios medžiagos yra toksiškos. Stabdomasis tirpalas 6100-05 (0,5 M K_3PO_4) yra dirglus.

Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (6100-06 – 6100-08) yra iš triušių.

Reikalingi tūriai:

| | | | Naudojamų šulinėlių skaičius | | | |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------|------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | | 3-4 | 5-6 | 7-8 | 9-10 |
| Skiedimo buferis (10 x) | 6100-02 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Plovimo tirpalas (10 x) | 6100-03 + H ₂ O | ml + ml | 1 + 9 | 2 + 18 | 3 + 27 | 4 + 36 |
| Konjugatas | 6100-09 + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 500 | 15 + 750 | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| Kontrolinis serumas | 6100-06 to -08 + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 | 10 + 190 |
| Tiriamas serumas | Serumas + skiedimo buferis | µl + µl | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| Substrato tirpalas | 6100-10 + 6100-04 | tabl. + ml | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 | 1 + 2.5 |

Procedūra:

1 žingsnis: Blokavimas:

Šulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį išsiurbiant arba pakratant juosteles virš kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su serumo mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės šulinėlį (tik skiedimo buferį, kontrolinis mėginys be serumo).

Į kitus tris iš eilės einančius šulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo ir teigiamo kontrolinių serumų (po 100 µl kiekvieno į atskirus šulinėlius).

Į likusius šulinėlius įpilti praskiesto tiriamo serumo (po 100 µl).

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti serumą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto baltymo A - alkalino fosfatazės konjugato į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Pašalinti konjugatą ir praplauti 4 x plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną šulinėlį.

Uždengti šulinėlius lipnia juosta ir inkubuoti 30 minučių 37°C temperatūroje.

Sustabdyti reakciją į kiekvieną šulinėlį įpilant po 100 µl stabdomojo tirpalo.

5 Žingnis: Absorbacijos matavimai:

Nuvalyti šulinėlių apačią, pašalinti burbulus ir matuoti absorbciją prie 405 nm.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (be serumo) mėginio reikšmę iš visų išmatuotų reikšmių. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus: absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200, A neigiamos kontrolės < 10% nuo A teigiamos kontrolės, A tuščio mėginio prieš orą < 0,350.

Silpnai teigiamo serumo 6100-07 antikūnų koncentracija buvo nustatyta tam, kad būtų galima diferencijuoti (optimaliai diskriminuoti) kliniškai dokumentuotus serumo atvejus nuo aspergiliozės imunokompetentiniams pacientams ir sveiko žmogaus serumų.

Ribinis mėginio rodiklis yra apibrėžiamas (po tuščio kontrolinio (be serumo) mėginio atėmimo) taip:

$$\text{Rodiklis} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinio mėginio absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio rodiklis yra mažesnis už **1.0**. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš ***Aspergillus fumigatus*** antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Pilka zona atitinka rodiklio reikšmę tarp **0,8-1.0**. Tokiu atveju mėginys yra laikomas įtartinu ir yra rekomenduojama pakartoti testą su tuo pačiu mėginiu arba su nauju to paties paciento mėginiu (serumu), paimtu po 2-4 savaičių.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio rodiklio reikšmė yra didesnė už **1.0**. Tokiu atveju IgG antikūnų koncentracija prieš ***Aspergillus fumigatus*** antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga.

Tai reiškia, kad pacientas serga aspergilioze ar yra padidintas jautrumas aspergiliozei.

Bet kuriuo atveju rezultatai turi būti sulyginami su radioklinikiniais paciento būklės stebėjimais.

Tiriant imunosupresinius pacientus, rekomenduojama papildyti testą A. *Fumigatus* antigenų serume nustatymu.

Šis kiekybinis ir atkartojamas testas leidžia sekti serologinę paciento evoliuciją.

Jautrumas ir tyrimo specifiškumas:

97% jautrumas nustatytas testuojant 32 serumus iš 19 pacientų, kenčiančių nuo įvairių aspergiliozių (11 lėtinės nekrotizuojanti aspergiliozės, 12 aspergiliozės, 2 aspergiliozinio sinusito ir 7 alerginės bronchų ir plaučių aspergiliozės). 22% jautrumas nustatytas testuojant 9 serumus iš 5 pacientų, kenčiančių nuo invazinės aspergiliozės.

98% specifiškumas buvo nustatytas testuojant 131 serumą iš 67 pacientų, kenčiančių nuo ne aspergiliozinių kvėpavimo ligų (kandidamikozės, tuberkuliozės, pneumocistozės, kriptokokozės, virusinės ar bakterinės pneumonijos).

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius 24 šulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 žmonių serumų mėginius atliekant 10 skirtingų tyrimų.

| | Atsikartojamumas | | Atkuriamumas | |
|---|------------------|-----------|--------------|-----------|
| | Mėginys 1 | Mėginys 2 | Mėginys 1 | Mėginys 2 |
| Vidurkis (absorbcija) | 0,352 | 1,767 | 0,410 | 1,985 |
| Standartinis nuokrypis (absorbcijos) | 0,027 | 0,069 | 0,038 | 0,096 |
| Pokyčio koeficientas (%) | 7,6 | 3,9 | 9,3 | 4,8 |

Literatūros šaltiniai:

Weig, M., Frosch, M., Tintelnot, K., Haas, A., Gross, U., Linsmeier, B. and Heesemann, J. (2001) Use of Recombinant Mitogillin for Improved Serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* –Associated diseases. J. Clin. Microbiol. **39**, 1721-1730.

Sarfati, S., Monod, M., Recco, P., Sulahian, A., Pinel, C., Candolfi, E., Fontaine, T., Debeaupuis, J.P., Tabouret, M., Latgé, J.P. (2006) Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. Diag. Microbiol. Inf. Disease **55**, 279-291.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

