

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus aspergiliozei nustatyti prie *Aspergillus fumigatus*

96 individualūs in vitro testai, skirti diagnostiniam ir profesionaliam laboratoriniam naudojimui

Naudojimo instrukcija produktui N° 6100
EC reg. N°: CH-201301-0006



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Aspergillus fumigatus* ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam IgG antikūnų prieš *Aspergillus fumigatus* žmogaus kraujo serume nustatymui. Serologija yra diagnozės priemonė ir negali būti naudojama kaip vienintelis diagnozės metodas. Testas skirtas tolimesniems pacientų tyrimams, kuriems įtariama aspergiliozės infekcija.

Kilmė:

Plaučių aspergiliozę sukelia įvairios patogeninės *Aspergillus* grybų rūšys, dažniausiai pasitaikanti *Aspergillus fumigatus*. Tai sukėlėjas aptinkamas dirvožemyje ir pūvančiose organinėse medžiagose. Žmonės įkvėpia šimtus sporų per dieną, bet tik žmonėms, turintiems rizikos veiksnių, atsiranda įvairių rūšių aspergiliozė: alerginė bronchopulmoninė aspergiliozė, alerginis sinusitas, aspergiloma ir lėtinė plaučių aspergiliozė. Pagrindiniai simptomai yra kosulys ir dusulys. Kadangi šie simptomai yra nespecifiniai, diagnozė grindžiama klinikinių, radiologinių, biologinių ir mikologinių kriterijų deriniu. Serologija yra svarbus kriterijus ir yra keletas metodų, skirtų tikrinti, stebėti ir patvirtinti.

Principas ir pateikimas:

Rinkinyje yra visos medžiagos, reikalingos 96 imunofermentinių tyrimų (ELISA) ląstelėse mikrotitravimo ulinėliuose, kurių sienelės padengtos šiuo mišiniu:

- Somatinis tirpalas ir metaboliniai *Aspergillus fumigatus* antigenai
- Rekombinantiniai antigenai: dipeptidilpeptidazės tipo V (chymotrypsin) ir ribonukleazė (mitogillin) iš *Aspergillus fumigatus*.

Specifiniai antikūnai mėginyje prisijungs prie jų antigenų, o plovimas pašalins nespecifinius antikūnus. Specifinių grybų antikūnų buvimas nustatomas su Baltymu A - alkalino fosfatazės konjugatu. Antrojo, plovimo etapo metu bus pašalintos nesurištos konjugatos. Surištieji antikūnai atlaisvinami pridėjant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Aspergillus fumigatus* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridėdamas reakcijos sustabdymui. Absorbancija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas gali būti atliekamas automatinėmis sistemomis, tačiau naudotojas privalo jį patvirtinti.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	6100-01	Ląstelės ELISA juostelės su <i>Aspergillus fumigatus</i> antigenais	96	ulinėliai
DILB	6100-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
WASH	6100-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
ENZB	6100-04	Fermento buferis	50	ml
STOP	6100-05	Stabdomas tirpalas (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
CONTROL -/+	6100-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
CONTROL +	6100-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
CONJ	6100-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
SUBS	6100-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rėmelis - ELISA 8- ulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti 2°-8°C temperatūroje (transportuoti kambario temperatūroje), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėžutėsono. Po pirminio atidarymo, visi reagentai yra stabilūs iki galiojimo termino datos, laikant 2°-8°C temperatūroje.

Reikalinga įranga, kuri nėra pateikiama su rinkiniu:

Pipetės (ml ir µl). Kolbos. Mėgintuvėliai skiedimams. Lipni juosta, kuria yra uždengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių sklalavimo įranga. Sūkurinis maiytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i maiomi.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio maielio 6100-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tučiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tučias laikiklio vietas jau panaudotais ulinėliais. Įdėti ulinėlių laikiklį(-ius) į rėmelį teisinga kryptimi. Į naujo sandariai uždaryti folinę pakuotę.

Skiedimo buferis: praskiesti koncentruotą skiedimo buferį (10 x) 6100-02 distiliuotu vandeniu santykiu 1/10. Tai naudojama kontrolinių mėginių, mėginių ir konjugatų praskiedimui. Skiestas buferis yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

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. Skiestas plovimo tirpalas yra stabilus 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Kontroliniai serumai: praskiesti 10 µl kontrolinio serumo 6100-06 iki -08 190 µl skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/20). Skiesti kontroliniai serumai yra stabilūs 2 mėnesius, esant 2-8°C temperatūrai.

Konjugatas: praskiesti konjugatą 6100-09 skiedimo buferio tirpalu (galutinis skiedimas 1/50). Konjugatą skiesti tyrimo dieną. Negalima laikyti atskiesto konjugato.

Substrato tirpalas: ištirpinti fosfatazės substrato tabletę(es) 6100-10 neskiestame fermento buferyje 6100-04 (1 tabletė 2,5 ml buferio). Maiyti tol, kol tabletė(ės) visiškai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlį nuo tiesioginės viesa. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti i dalies hidrolizuotas, todėl reikia i mesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 6100-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti žmogaus serumą. Serumai turėtų būti laikomi 2-8°C temperatūroje (jei tyrimas atliekamas per kelias dienas), kitu atveju, laikyti -20° C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumaiyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

Išpėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N _a N ₃)	Mertiolatas
Skiedimo buferis (10 x)	6100-02	0,1 %	0,02 %
Plovimo tirpalas (10 x)	6100-03	0,05 %	/
Fermento buferis	6100-04	0,01 %	/
Kontroliniai serumai (20 x)	6100-06 iki -08	0,1 %	0,02 %
Konjugatas (50 x)	6100-09	0,1 %	/

Naudojamoje koncentracijoje natrio azidas ir mertiolatas nekelia jokios toksikologinės rizikos sąlytyje su oda ir gleivinėmis.

- Stabdomasis tirpalas 6100-05 (0,5 M K₃PO₄) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (6100-06 iki -08) yra iš triušių.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemai yti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su io rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitaloti dangtelių, kad būtų išvengta užterimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.

Atliekų alinimas:

Visos, iame bandyme naudojamos medžiagos yra laikomos pavojingomis atliekomis. Remtis alies ir regioniniais įstatymais ir nuostatomis dėl pavojingų atliekų alinimo.

Procedūra:

Tyrimo metu, vengti burbuliukų susidarymo ulinėliuose.

1 žingsnis: Blokavimas:

Ulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį į siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

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

Į kitus tris į eilės einančius ulinėlius atitinkamai įpilti po 100 µl praskiesto neigiamo, silpnai teigiamo (ribinis) ir teigiamo kontrolinio serumo. Atliekant tyrimą su daugiau nei 25 mėginiais, rekomenduojame užpildyti tris paskutinius ulinėlius su kontroliniais serumais kaip dublikatą.

Į likusius ulinėlius įpilti praskiestus mėginius (po 100 µl).

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

Paalinti serumą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

3 žingsnis: Inkubacija su konjugatu:

Įpilti po 100 µl praskiesto konjugato į kiekvieną ulinėį (įskaitant mėginį be serumo).

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

Paalinti konjugatą ir praplauti 4 x su ~ 250 µl plovimo tirpalu.

4 žingsnis: Inkubacija su substratu:

Įpilti po 100 µl substrato tirpalo į kiekvieną ulinėį.

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

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

5 žingsnis: Absorbacijos matavimai:

Jei reikia, nuvalyti ulinėlių apačią ir paalinti burbuliukus. Matuoti absorbciją prie 405 nm per 1 val. nuo stabdomojo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tu čio kontrolinio (be serumo) mėginio reikmę iš visų išmatuotų reikmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- absorbcija (A) teigiamos kontrolės > 1,200
- A neigiamos kontrolės < 10 % nuo A teigiamos kontrolės
- A tu čio mėginio prieš orą < 0,350

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: www.bordier.ch.

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

Ribinis mėginio indeksas, atėmus mėginį be serumo, yra nustatomas:

$$\text{Indeksas} = \frac{\text{Mėginio absorbcija}}{\text{Ribinė serumo absorbcija}}$$

Rezultatas yra **neigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra žemesnis nei **0,8**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie ***Aspergillus fumigatus*** tirpius antigenus yra klinikiškai nereikšminga.

Pilka zona atitinka indeksą nuo **0,8** iki **1,0**. Šiuo atveju, mėginys laikomas tarpiniu, todėl rekomenduojama pakartoti testą su tuo pačiu mėginiu arba su nauju, to paties paciento serumu, paimtu po 2-4 savaitių.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie ***Aspergillus fumigatus*** tirpius antigenus yra laikoma klinikiškai reikšminga. Šis rezultatas sukelia aspergiliozės ar aspergiliozės sensibilizaciją.

Jautrumas ir specifiškumas:

97% jautrumas nustatytas testuojant 147 pacientų 230 serumų su įvairiomis aspergiliozės formomis (104 lėtinė plaučių aspergiliozė (įskaitant 17 aspergilomos) ir 43 alerginė bronchopulmoninė aspergiliozė). 90,3% specifiškumas nustatytas testuojant 205 pacientų 206 serumus su kvėpavimo simptomais, kai su ***Aspergillus*** susijusi liga buvo atmesta.

Sąveika:

Vidinis vertinimas parodė, kad hemoraginiai, lipeminiai ar ikteriniai serumai neturi įtakos testo rezultatams.

Tikslumas:

Atsikartojamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius 24 ulinėliuose vieno tyrimo metu. Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių 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

Apribojimai:

22% jautrumas nustatytas testuojant 5 pacientų 9 serumus su invazine aspergilioze. Imunosupresiniams pacientams, rekomenduojama atlikti tyrimą, nustatant serumo ***A. fumigatus*** antigenus. 97% jautrumas nustatytas testuojant 24 pacientų 36 serumus su ne aspergillus kvėpavimo takų ligomis (kandidozė, tuberkuliozė, pneumocistozė ir kriptokokozė).

Infekcinės ligos diagnozė neturėtų būti nustatyta remiantis vieno testo rezultatais. Tikslios diagnozės nustatymui reikėtų atsižvelgti į endeminę situaciją, ligos istoriją, simptomus, vizualizaciją ir serologinius duomenis. Sutrikusios imuninės sistemos pacientų ir naujagimių serologiniai duomenys yra riboti.

Literatūros altiniai:

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.

Barrera, C., Richaud-Thiriez, B., Rocchi, S., Rognon, B., Roussel, S., Grenouillet, F., Laboissière, A., Dalphin, J.C., Reboux, G. and Millon, L. (2016) New commercially available IgG kits and time-resolved fluorometric IgE assay for diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Clin Vaccine Immunol* **23**, 196–203.

Dumollard, C., Bailly, S., Perriot, S., Brenier-Pinchart, M.P., Saint-Raymond, C., Camara, B., Gangneux, J.P., Persat, F., Valot, S., Grenouillet, F., Pelloux, H., Pinel, C., Cornet, M. and Grenoble ***Aspergillus*** Committee. (2016) Prospective evaluation of a new ***Aspergillus*** IgG enzyme immunoassay kit for diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* **54**, 1236–1242.



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

