

Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Imunologiniai fermentų tyrimai žmogaus aspergilozei nustatyti prie *Aspergillus fumigatus*

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



Naudojimo instrukcija produktui N° 6100
UDI-DI: 07640158216101



Naudojimo paskirtis:

Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kokybiniam IgG antikūnų prie *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 sukelėjas aptinkamas dirvožemyje ir pūvančiose organinėse medžiagose. Žmonės įkvepia 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) laukimuose 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 pašalintas nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridėjant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Aspergillus fumigatus* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridodamas reakcijos sustabdymui. Absorbcija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

Testas yra rankinis, tačiau jį galima atlikti ir automatinės sistemos, kurias turi patvirtinti naudotojas.

Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

WELL	6100-01	Laukimos 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	Stabdomasis 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
		Rémelis - ELISA 8- šulinėlių laikikliams	1	vienetas

Galiojimo terminas ir laikymo sąlygos:

Rinkinį reikia laikyti nuo +2°C iki +8°C (transportas patvirtintas nuo -20°C iki +37°C 21 dieną), vengti ilgalaikio poveikio su tiesiogine viesa. Galiojimo data ir partijos numeris yra atspausdintas ant dėutės. Po pirmo atidarymo, visi reagentai yra stabilūs iki galiojimo termino datos, laikant nuo +2°C iki +8°C.

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 skalavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

Reagentų paruošimas prieš naudojimą:

Prieš naudojimą visus reagentus palaikykite nuo +20°C iki +30°C mažiausiai 1 valandą ir sumaišykite.

ELISA ulinėliai: atidaryti folinio maielio 6100-01 oną ir paimti reikalingą skaičių ulinėlių (vieną tu čiam, tris kontroliniams mėginiams ir kiekį priklausomai nuo mėginių skaičiaus). Įdėti paruoštus ulinėlius į 8-ulinėlių laikiklį(-ius). Jei reikia, užpildyti tu čias 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, nuo +2°C iki +8°C.

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, nuo +2°C iki +8°C.

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, nuo +2°C iki +8°C.

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 ištirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės šviesos. Tabletės ir substrato tirpalai turi būti bespalviai arba gali turėti tik iek tiek geltoną atspalvį. Jei tabletė ar substrato tirpalas pageltonuoja, jis galėjo būti iš dalies hidrolizuotas, todėl reikia išmesti. Negalima laikyti atskiesto substrato tirpalo.

Stabdomasis tirpalas: reagentą 6100-05 naudoti neskiestą.

Mėginių surinkimas ir paruošimas:

Naudoti žmogaus serumą. Laikykite tarp +2°C iki +8°C, jei analizuojama per 7 dienas, kitu atveju, laikyti -20°C ar žemesnėje temperatūroje. Neužaldykite ir neatildykite bandinių pakartotinai.

Sumaišyti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginyje su 1,0 ml). Negalima laikyti praskiestus mėginius.

Išpėjimai ir atsargumo priemonės:

Toksiški junginiai atsiranda naudojant šią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N ₃ 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.

Komponentas	Pavojingas komponentas	Pavojaus piktograma	Pavojaus pareiškimas	Atsargumo pareiškimas
Stabdomasis tirpalas	tribazinis kalio fosfatas		Smarkiai pažeidžia akis.	Naudoti akių apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: Atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis.

- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (6100-06 iki -08) yra gyvūnų kilmės (triušiai) ir turi būti tvarkomi atsargiai.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nemaityti skirtingų partijų reagentų su Bordier ELISA komplektu.
- Nenaudoti kitų gamintojų reagentų kartu su šio rinkinio reagentais.
- Nenaudoti reagentų pasibaigus jų galiojimo laikui.
- Tvirtai užsukti reagento buteliuką po naudojimo, nekaitalioti dangtelių, kad būtų išvengta užteršimo.
- Kiekvienam mėginiui naudoti naują ir varų pipetės antgalį.
- Negalima pakartotinai naudoti mikroskopinių ulinėlių.
- Venkite mikrošulinėlių sugadinimo dėl mechaninio poveikio (antgaliukai / kūgiai, purkštukai).
- Etiketėse naudojamų simbolių aprašymus galima rasti svetainėje www.bordier.ch.

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: Prieš inkubaciją:

Užpildykite duobutes 250 µl skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuokite 5–15 minučių nuo +20°C iki +30°C temperatūroje.

Pašalinti skiedimo buferį i siurbiant arba pakratant juosteles vir kriauklės.

2 žingsnis: Inkubacija su mėginiais:

Įpilti 100 µl skiedimo buferio į pirmą pirmos juostelės ulinėį (mėginį be serumo).

Į kitus tris i 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 stabdymo tirpalo įpilimo.

Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę išvisų išmatuotų reikšmių. Jei reikia, apskaičiuoti dubliuotas kontrolinio serumo vidutines absorbcijos reikšmes. Testas yra galiojantis, jei atitinka šiuos kriterijus:

- Teigiamos kontrolės absorbcija (A) > 1,200
- A silpnos teigiamos kontrolės > 11% A teigiamos kontrolės
- A neigiamos kontrolės < 8% nuo A teigiamos kontrolės
- A mėginį be serumo < 0,350

Jei mėginio skleidžiamas signalas viršija mikroplokštelių skaitytuvo matavimo diapazoną, turėtų būti priskirta vertė, atitinkanti viršutinį skaitytuvo matavimo diapazoną.

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) kliniškai 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** antigenus yra kliniškai 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 savaičių.

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

Jei rezultatas yra teigiamas arba abejotinas, rekomenduojame atlikti patvirtinimo testą (dažniausiai Western Blot metodu), jei toks tyrimas yra prieinamas arba reikalaujama pagal nacionalinius teisės aktus.

Analitiniai pasirodymai:

Analitinis specifiškumas:

97% specifiškumas buvo nustatytas 36 serumams iš 24 pacientų, sergančių ne aspergilinėmis kvėpavimo takų ligomis (kandidoze, tuberkulioze, pneumocistoze ir kriptokokoze).

Nebuvo pastebėta jokių teigiamų ar neigiamų trukdžių, susijusių su suprafiziologinėmis hemoglobino, lipidų ar bilirubino koncentracijomis serumuose, papildytuose interferencinėmis medžiagomis.

Tikslumas:

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

Atkuriamumas buvo vertinamas testuojant 2 mėginių serumų mėginius dubliuojami 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	0,102
Pokyčio koeficientas (%)	7,6	3,9	9,2	5,1

Klinikiniai pasirodymai:

Diagnostinis jautrumas:

Nustatytas 97% jautrumas 230 serumų iš 147 pacientų, sergančių įvairia aspergilioze (104 lėtine plaučių aspergilioze (įskaitant 17 aspergilomų) ir 43 alerginėmis bronchopulmoninėmis aspergiliozėmis).

Diagnostikos specifiškumas:

90% specifiškumas buvo nustatytas 206 serumuose iš 205 pacientų, turinčių kvėpavimo takų ligų simptomų, kurių atžvilgiu buvo atmesta su *Aspergillus* susijusi liga.

Teigiama ir neigiama nuspėjamoji vertė:

Aukščiau paminėtose populiacijose nustatytas 92% PPV ir 96% NPV.

Numatomos vertės normaliose ir paveiktose populiacijose:

Įprastoje populiacijoje, kurią sudaro 99 Šveicarijos kraujo donorai, 98 serumai iš Šveicarijos infekcinių ligų skyriaus ir 90 serumų iš pacientų, įtariamų aspergilioze, tačiau kai ši liga tikrai buvo atmesta, tikėtina Indekso vertė yra 0,16.

Paveiktuose 63 pacientų, sergančių įvairia aspergilioze, serumuose, tikėtina Indekso vertė yra 2,16.

Incidentai:

Apie bet kokią rimtą incidentą, susijusį su prietaisu, turi būti pranešama gamintojui ir valstybės narės, kurioje yra įsisteigęs naudotojas ir (arba) pacientas, kompetentingai institucijai.

Apribojimai:

Nustatytas 22% jautrumas 9 serumams iš 5 pacientų, sergančių invazine aspergilioze. Pacientams, kurių imunitetas nusilpęs, testą rekomenduojama užbaigti nustatant *A. fumigatus* antigenus serume.

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 šaltiniai:

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.

Wilopo, B., A., P., Hunter, E., S., Richardson, M., D. and Denning, D., W. (2020) Optimising the cut-off of the Bordier *Aspergillus* IgG ELISA for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. J. Microbiol. Methods **176**.

Yamagishi, I., Bamba, Y., Moro, H., Kanno, N., Tsuruma, H., Hakamata, M. et al. (2024) Retrospective Comparison of Two *Aspergillus* IgG Enzyme Immunoassays for Diagnosing Pulmonary Aspergillosis. Med. Mycol. J. **65** : 41-47.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.

Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.

+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

