

# 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  
EC reg. N°: CH-201301-0006 - UDI-DI: 07640158216101



## Naudojimo paskirtis:

Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA rinkinys yra skirtas kiekybiniam 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 sukėlėjas aptinkamas dirvožemyje ir pūvančiose organinėse medžiagose. Žmonės įkvėpia šimtus sporų per dieną, bet tik žmonėms, turintiems rizikos veiksnių, atsirasi 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 imunofermenčių 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 pašalintas nesurištas konjugatas. Surišti antikūnai atlaisvinami pridendant pNPP substrato, kuris pagelsta dėl arminės fosfatazės. Spalvos intensyvumas yra proporcingas *Aspergillus fumigatus* specifinių antikūnų kiekiui mėginyje. Kalio fosfatas yra pridodamas reakcijos sustabdymui. Absorbicija esant 405 nm nuskaityta naudojant ELISA mikroplokštelės skaitytuvą.

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

## Medžiagos, esančios rinkinyje (96 testai):

<b>WELL</b>	6100-01	Ląstelės ELISA juostelės su <i>Aspergillus fumigatus</i> antigenais	96	ulinėliai
<b>DILB</b>	6100-02	Koncentruotas skiedimo buferis (10 x), violetinės spalvos	50	ml
<b>WASH</b>	6100-03	Koncentruotas plovimo tirpalas (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	6100-04	Fermento buferis	50	ml
<b>STOP</b>	6100-05	Stabdomas tirpalas (0,5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	6100-06	Neigiamas kontrolinis serumas (20 x), žalias dangtelis	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	6100-07	Silpnai teigiamas kontrolinis serumas (ribinė kontrolė, 20 x), geltonas dangtelis	200	μl
<b>CONTROL +</b>	6100-08	Teigiamas kontrolinis serumas (20 x), raudonas dangtelis	200	μl
<b>CONJ</b>	6100-09	Baltymo A - alkalino fosfatazės konjugatas (50 x), violetinis dangtelis	300	μl
<b>SUBS</b>	6100-10	Fosfatazės substratas (para-nitrofenilfosfatas)	20	tablečių
		Multipipetės rezervuaras, 25 ml	1	vienetas
		Rėmelis - ELISA 8- šulinėlių 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 dėutės ono. 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 už dengiami ulinėliai inkubacijos metu. Distiliuotas vanduo. Inkubatorius (37°C). ELISA skaitytuvas (405 nm). Rankinė ar automatinė ulinėlių sklalavimo įranga. Sūkurinis mai ytuvas. Laikmatis.

### **Reagentų paruošimas prieš naudojimą:**

Prie naudojimą, visi reagentai laikomi kambario temperatūroje ir i mai omi.

**ELISA ulinėliai:** atidaryti folinio mai elio 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, 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). Mai yti tol, kol tabletė(ės) visi kai i tirps. Substratą skiesti tyrimo dieną ir saugoti mėgintuvėlių nuo tiesioginės viesos. 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. Sumai yti mėginius ir skiesti su 1/201 buferio tirpalu (pav., 5 µl mėginys su 1,0 ml).

### **Įspėjimai ir atsargumo priemonės:**

Toksi ki junginiai atsiranda naudojant ią koncentraciją:

Komponentas	Numeris	Natrio azidas (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	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 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) yra dirglus.
- Neigiamas, silpnai teigiamas ir teigiamas kontroliniai serumai (6100-06 iki -08) yra iš triušų.
- Visus reagentus ir mėginius naudoti kaip galimai infekcinę medžiagą.
- Nema i 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 i vengta 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](http://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: Blokavimas:

Ulinėlius pilnai užpildyti skiedimo buferio tirpalu.

Inkubuoti 5 - 15 minučių kambario temperatūroje (blokavimas).

Pašalinti skiedimo buferį ir 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 iš 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 stabdomo tirpalo įpilimo.

## Interpretacija:

Atimkite tuščio kontrolinio (mėginį be serumo) mėginio reikšmę iš visų 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

Esamų partijų kokybės patikras galima rasti mūsų interneto svetainėje: [www.bordier.ch](http://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 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 savaičių.

Rezultatas yra **teigiamas**, kai analizuojamo mėginio indeksas yra aukštesnis nei **1,0**. Tokiu atveju, IgG antikūnų koncentracija prie **Aspergillus fumigatus** antigenus yra laikoma klinikiškai 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:

Nustatytas 22% jautrumas 9 serumams iš 5 pacientų, sergančių invazine aspergilioze. Pacientams, kurių imunitetas nusilpęs, testą rekomenduojama užbaigti nustatant *A. fumigatus* antigenus serume. 97% specifiškumas buvo nustatytas 36 serumams iš 24 pacientų, sergančių ne aspergilinėmis kvėpavimo takų ligomis (kandidoze, tuberkuloze, 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 atliekant 10 skirtingų tyrimų.

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

Šių rezultatų negalima įvertinti, nes nėra sertifikuotos šios analizės etaloninės medžiagos:

- Analitinis jautrumas (aptikimo ir kiekybinio įvertinimo ribos)
- Tikslumas
- Tikrumas
- Matavimo diapazonas
- Linijškumas

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

### Apribojimai:

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**.



**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](http://www.bordier.ch)

