

ASPERGILLUS

CE



Western Blot IgG

Diagnóstico *in vitro* ensaio Immunoblot
Técnica manual / semi-automática

#ASP-WB24G : 24 testes

#ASP-WB12G : 12 testes

#ASP-WB96G : 96 testes

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

Encontre mais informações e instruções de uso no seu idioma no nosso site

www.ldbiodiagnostics.com

UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

ASPERGILLUS Western Blot (WB) IgG é um teste qualitativo de uso único de diagnóstico serológico de IgG por immunoblot para a aspergilose, concebido para ser um teste confirmatório de um resultado positivo ou equívoco obtido através dos testes clássicos de despiste.

PRINCÍPIO DO TESTE

Técnica de Western Blot

Os antígenos (larvas de *Aspergillus fumigatus*), uma vez separados por eletroforese, são ligados por electroblotting à superfície de uma membrana de nitrocelulose (a que se chama a transferência) cortada em 24 tiras numeradas de 1 a 24.

CONDUÇÃO DO TESTE

Cada amostra de soro a testar é incubada separadamente com uma tira. Os anticorpos anti-*Aspergillus* potencialmente presentes na amostra ligam-se seletivamente aos antígenos de *A. fumigatus*. O conjugado fosfatase alcalina-anti IgG humana liga-se então aos anticorpos anti-*Aspergillus*. Por fim, os imunocomplexos reagem com o substrato. Os antígenos reconhecidos pelos anticorpos anti-*Aspergillus* do tipo IgG presentes nas amostras são revelados como bandas transversais de cor roxa.

REAGENTES FORNECIDOS

Padrão: embalagem de 24 testes (#ASP-WB24G)

italic: embalagem de 12 testes (#ASP-WB12G) - **bold**: Embalagem de 96 testes (#ASP-WB96G).

ID	Quant.	Descrição	Composição
R1	1	Pasta(s) de 24 (12, 4x24) TIRAS: padrões pré-cortados + coloridos. (Cada pasta e cada transferência é identificada por um número de série único)	Nitrocelulose sensibilizada. Peso molecular colorido (kDa): Azul: 250, Azul: 150, Azul: 100, Rosa: 75, Azul: 50, Verde: 37, Rosa: 25, Azul: 20, Azul: 15, Amarelo: 10.
R2	1	Frasco de 30 (30, 125) ml de TAMPÃO DA AMOSTRA (Pronto a utilizar - solução rosa).	Tampão + surfactante.
R3	1	Frasco(s) de 30 (30, 2x60) ml de CONJUGADO ANTI IgG (Pronto a utilizar - solução azul).	Tampão + conjugado de soro de cabra policlonal anti-IgG humana com fosfatase alcalina + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.
R5	1	Frasco de 30 (30, 125) ml de SUBSTRATO (Pronto a utilizar - frasco castanho opaco).	Tampão + NBT + BCIP + estabilizantes
R6	1	Frasco de 60 (60, 250) ml de TAMPÃO DE LAVAGEM CONCENTRADO 10x (A diluir 10 vezes em água destilada - solução incolor).	Tampão + surfactante.
R10	1	Tubo de 100 (100, 2x100) µl de SORO DE CONTROLO POSITIVO (Pronto a utilizar - tampa vermelha).	Tampão + conjunto de soros humanos positivos para <i>Aspergillus</i> por serologia + NaN3 (<0,1%) + estabilizantes.

R1: A letra antes de cada número de tira é específica para o parâmetro.

R2, R3, R5 e R6 são comuns a todos os kits e possuem um número de lote único, dependendo apenas da sua data de produção. **É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.**

R10 é calibrado em immunoblot de acordo com um lote de referência e é dedicado apenas a esta técnica.

R3, R10 (NaN₃): EUH 032 - Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.

EUH 210 Ficha de segurança fornecida a pedido bem como no nosso site www.ldbiodiagnostics.com.

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO DISPONIBILIZADO

- Tabuleiros de incubação multicanal em polipropileno para mini-blots (#WBPP-08 ou equivalente).
- Plataforma oscilatória para immunoblots, sistema de vácuo para líquidos (os tubos #WBPP-08 que fornecemos podem ser esvaziados por simples inversão).
- Tubos e material para recolher as amostras, cilindros graduados, contentores adaptados. Pipetas automáticas, micropipetas e pontas descartáveis (volumes de 10 µl, 1,2 ml e 2 ml).
- Água destilada ou desionizada. Papel absorvente (por ex. papel de filtro Whatman), fita adesiva transparente.
- Luvas, pinça para manipular as tiras, cortador ou bisturi, régua plana transparente.

Nota: Os nossos reagentes podem ser utilizados num processador automático de immunoblots. **Devem tomar-se precauções relativamente a possíveis contaminações químicas dos nossos reagentes se o processador for partilhado com reagentes de outro fabricante** (exemplo conhecido: contaminação por TWEEN 20) e a possíveis contaminações bacterianas. Frascos de reserva para o processador. Depois do processamento, não voltar colocar os restos de reagentes utilizados nos frascos originais.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Conservar entre 2 e 8 °C. Os reagentes do kit são estáveis até à data de validade indicada na embalagem exterior e nos rótulos dos frascos. Não use reagente contaminado ou turvo. O tampão de lavagem diluído a 1:10 é estável durante 2 meses a +2 a +8 °C e uma semana à temperatura ambiente.

CUIDADOS NA UTILIZAÇÃO

Segurança

- Apenas para utilização *in vitro*. Apenas para uso profissional. Apenas para pessoal treinado tecnicamente. Manusear de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais e considerar todos os reagentes e todas as amostras como potencialmente tóxicos e/ou infecciosos.
- Usar bata, luvas e óculos: não beber, comer ou fumar no laboratório. Não pipetar com a boca.
- O controle positivo é um soro de origem humana que foi inativado para os vírus HIV 1 e 2, hepatite B e hepatite C. Contudo, deve ser manuseado como um produto potencialmente infeccioso.
- O substrato contém uma mistura de NBT e BCIP, tóxica por contacto (pele e mucosas) e por inalação.
- Os reagentes contêm azida de sódio, que pode formar sais metálicos explosivos com o chumbo e o cobre. Enxaguar qualquer derrame com água.
- Eliminar os resíduos (amostras, pontas, tubos, líquido de lavagem, reagentes usados, ...) de acordo com as boas práticas utilizadas na indústria e as regulamentações atuais do país.
- Qualquer incidente grave deve ser objeto de declaração ao fabricante e às autoridades competentes.

Cuidados

- Leia e interprete os resultados sob luz branca direta.
- É preferível utilizar todos os reagentes de um mesmo lote. Se forem utilizados lotes diferentes, assegurar a rastreabilidade.
- Utilizar as tiras por ordem numérica. Não misturar tiras com diferentes números de série; utilizar as transferências em sequência. Estabelecer um plano de distribuição específico antes de iniciar o teste.

- Não tocar nas tiras com os dedos; utilizar uma pinça.
- Os reagentes devem ser bem misturados antes da utilização, em especial o tampão de lavagem concentrado.
- Fechar os frascos após a utilização; não utilizar se tiver ocorrido introdução acidental de uma substância nos reagentes. Não utilizar reagente de um frasco que apresente sinais de vazamento. Não utilizar soluções turvas ou precipitadas.
- Utilizar apenas pontas de pipeta descartáveis. Evitar qualquer contaminação entre canais. Ter atenção à formação de espuma ou bolhas nas pontas de pipeta (contaminação bacteriana dos frascos de reagentes).
- Lavar os tabuleiros de incubação apenas com água limpa seguida de água destilada (nunca utilizar detergente ou lixívia).
- A omissão de uma amostra ou a distribuição de um volume inadequado pode tornar o teste negativo ou positivo, independentemente do seu verdadeiro estado.

RECOLHA DE AMOSTRAS

Colher as amostras em tubos secos, de forma asséptica. É necessário um mínimo de 10 µl de soro.

Manter as amostras a 2 a 8 °C até serem processadas. Se for necessário armazená-las por mais de uma semana, congelar as amostras a -20 ± 5 °C. Não utilizar uma amostra contaminada. Evitar congelar e descongelar as amostras repetidamente.

Embora não tenha sido observada nenhuma reação cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Tampão de lavagem: Para 4 testes, num frasco limpo, diluir 10 ml de concentrado de lavagem 10x (**R6**) em 90 ml de água destilada ou desionizada. Tenha o cuidado de misturar bem o tampão diluído.

PROCEDIMENTO DO TESTE

Nota importante: É recomendado efetuar séries multiparamétricas (ver gama de immunoblot LDBIO) a fim de limitar o número de frascos abertos e de assegurar um melhor controlo de qualidade.

1. Preparar o plano de distribuição das amostras e do controlo positivo C+ (**R10**).

O teste só pode ser tecnicamente validado e a identificação feita, para um determinado número de série, ou reveladas as bandas específicas, através da utilização deste controlo. Uma tira C+ não pode ser usada para interpretar os resultados das tiras de um blot com um número de série diferente.

2. Cortar o número necessário de tiras (R1) utilizando um bisturi e uma régua plana transparente limpa e seca, mantendo a linha azul de posicionamento nas tiras: manter as tiras firmemente no seu lugar com a régua e cortá-las pelo lado da tensão (os números são visíveis através da régua).
3. Distribuir 1,2 ml de tampão da amostra (R2) em cada canal, de acordo com o plano estabelecido.
4. Deixe as tiras se reidratarem na superfície do tampão por aproximadamente 2 minutos, com o número visível no topo, ENTÃO, agite suavemente a bandeja para mergulhá-las totalmente no tampão
5. Distribuir as amostras e controlo(s) positivo(s): de acordo com o plano de distribuição, a uma taxa de 10 µl por canal. Agitar suavemente o tabuleiro após cada dispensa. Colocar o tabuleiro numa plataforma oscilatória. **Incubar durante 90 min. ± 5 min. a 20 a 26 °C.**
6. Passo de lavagem: Esvaziar o conteúdo dos canais com uma pipeta de Pasteur ou voltando o tabuleiro de incubação ao contrário. Verter 2 a 3 ml de tampão de lavagem diluído em cada canal. Incubar na plataforma

oscilatória durante 3 min. Repetir duas vezes e, em seguida, esvaziar o conteúdo dos canais. Assegurar que as tiras não se voltam durante estes passos.

7. Verter 1,2 ml de conjugado anti IgG (R3) em cada canal. Colocar o tabuleiro na plataforma oscilatória. **Incubar durante 60 min.** ± 5 min. a 20 a 26 °C.
8. Passo de lavagem: repetir o passo 6.
9. Deitar 1,2 ml de substrato NBT/BCIP (R5) em cada um dos canais. Colocar na plataforma oscilatória e proteger da luz direta. **Incubar durante 60 min.** ± 5 min. a 20 a 26 °C.

Independentemente do parâmetro, monitorizar a revelação da cor. A revelação pode ser interrompida se a cor de fundo da tira escurecer de tal modo que a leitura seja difícil (a qualidade dos passos de lavagens possui uma influência fundamental na cor de fundo). Ter em atenção que as tiras ficarão mais claras quando secas.

10. Interromper a reação, aspirando o substrato com uma pipeta de Pasteur ou voltando a tina de incubação ao contrário e deitando 2 ml de água destilada nos canais. Repetir este último passo de lavagem mais uma vez.
11. Secagem das tiras: Com os canais ainda cheios de água, pegar nas tiras pela extremidade numerada utilizando uma pinça e depositá-las, com o número visível, sobre um papel absorvente de Whatman. Deixar secar ao ar. A cor das tiras aclarará naturalmente enquanto secam. A interpretação só deve ser feita depois de concluída a secagem.
12. Conservação: Transferir as tiras para uma folha de papel, que será utilizada para as arquivar. Alinhar as linhas de posicionamento. Mantendo-as no lugar com a régua plana, colar a extremidade superior das tiras com a fita adesiva transparente.

Para uma boa interpretação, as tiras deve ser ordenadas por transferência e pela sua ordem numérica, espaçadas com um máximo de alguns milímetros entre si. Não é fiável comparar tiras que estejam muito afastadas (por ex. a nº 2 com a nº 15). **É perigoso** (resultados falsos) comparar tiras de diferentes kits (tiras com números de série diferentes).

CONTROLO DE QUALIDADE E INTERPRETAÇÃO

O controlo do soro (R10) disponibilizado com o kit deve ser sistematicamente incluído em qualquer série de immunoblot. Ele mostra o perfil típico e permite a validação técnica da boa execução do teste (as bandas devem aparecer muito distintamente na tira) e calibrar exatamente a posição e aspeto das bandas específicas de modo a permitir a interpretação dos resultados das tiras da mesma transferência (mesmo número de série).

Nota Bene: O perfil de controle positivo (R10) pode variar de acordo com o número de lote dos reagentes utilizados. As imagens correspondentes estão disponíveis no nosso website www.ldbiodiagnostics.com como exemplo.

Descrição das bandas

Uma amostra positiva pode apresentar diversas bandas situadas entre 10 e 200 kDa. Na prática, e por motivos de especificidade, apenas a zona de baixo peso molecular (≤ 30 kDa) é retida para leitura.

4 bandas, **por vezes desdobradas**, foram retidas pela sua especificidade, a sua sensibilidade e a sua facilidade de leitura. Situadas em 16, 18-20, 22 e 30 kDa, são denominadas: **P16, P18-20, P22, P30**.

Duas outras bandas específicas são por vezes encontradas em 10 kDa e, mais raramente, em 15 kDa. Menos visíveis e pouco frequentes, não são tidas em consideração para a interpretação do teste.

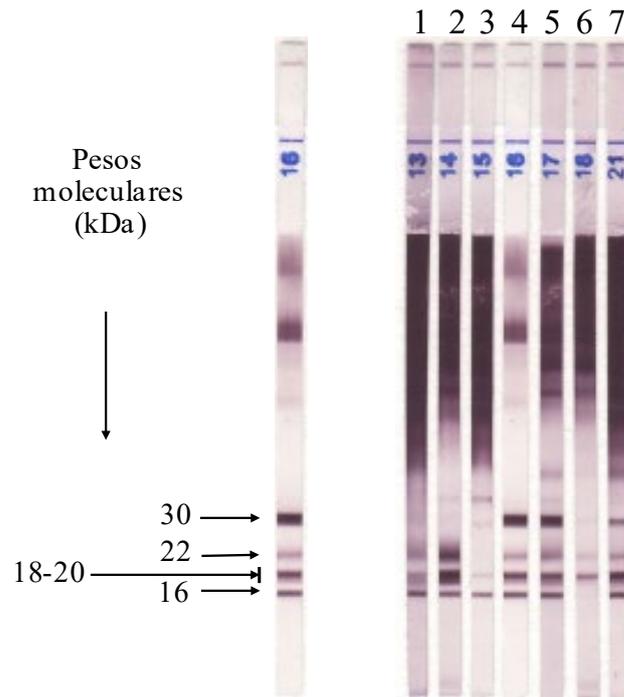


Fig. 1: Exemplos de resultados positivos

Os perfis são dados como exemplos. As tiras são marcadas com a letra "I" específica do parâmetro do lote "08016".

Interpretação

A presença **simultânea** de 2 bandas bem definidas entre **P16, P18-20, P22 e P30** é indicativa da presença de anticorpos específicos anti-*Aspergillus*.

Para validar os resultados, compare sempre o perfil do immunoblot de cada amostra com o do controlo positivo R10. O aspeto das bandas é importante para a interpretação do teste.

Observação: para certos soros, as bandas específicas podem parecer muito claras, sob a forma de vestígios mais ou menos presentes consoante os leitores. Nos casos em que aparecerem pelo menos duas bandas específicas de modo assim tão fraco, o resultado obtido é considerado positivo.

LIMITAÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- O diagnóstico de uma doença infecciosa não pode ser estabelecido com base em um único resultado de teste.
- Os resultados serológicos devem ser interpretados de acordo com as informações disponíveis (por exemplo, epidemiologia, clínica, imagem, biologia, etc.) de forma a estabelecer um diagnóstico. Não devem ser utilizados como base para o diagnóstico apenas com base na sua positividade.

DESEMPENHOS (ver referências bibliográficas)

A avaliação dos desempenhos do estojo ASPERGILLUS WB IgG foi realizada por quatro laboratórios de referência franceses independentes.

Sensibilidade (Se)

308 soros de 158 doentes foram reunidos retrospectivamente em quatro Centros Hospitalares Universitários (CHU) segundo os seus dados clínicos e serológicos. Cada soro foi testado em Imunoeletroforese (IEP) e WB por cada um dos CHU. Os soros foram divididos em duas categorias: as aspergiloses crónicas (n=267) e os doentes atingidos por colonização aspergilar (n=41).

GRUPO	SOROS (n)	WB POSITIVOS (%)	IEP POSITIVOS (%)
Aspergilose crónica	267	94.0%	87.6%
Aspergilose pulmonar crónica	197	93.4%	87.3%
Aspergiloma não complicado	13	92.3%	100.0%
ABPA	57	96.5%	86.0%
Colonização por Aspergillus	41	73.2%	53.7%
Mucoviscidose positivos	18	100.0%	72.2%
Mucoviscidose negativos	23	52.2%	39.1%
TOTAL	308	91.2%	83.1%

Tabela 1: Sensibilidade comparada (%) do imunoblot (WB) e da imunoelectroforese (IEP) em 308 amostras (n): 267 aspergiloses crónicas e 41 colonizações por *Aspergillus*.

Especificidade (Sp)

A especificidade do teste é de **93,9%**. Foi calculada num painel de 212 soros de doadores de sangue.

Observação: Esta percentagem de resultados positivos entre os soros de doadores de sangue poderia dever-se à omnipresença de *Aspergillus* no ambiente, provocando em certas pessoas o aparecimento de uma resposta imunitária.

Conclusão

A correlação entre a WB *Aspergillus* e o estado clínico é excelente.

Sensibilidade Se = 91,2% [CI95 90 - 93%]

Especificidade Sp = 93,9% [CI95 89,7 - 96,7%]

Os intervalos de confiança são calculados de acordo com o método de Clopper-Pearson com correcção de continuidade.

Reprodutibilidade

Foi testada a reprodutibilidade inter-série e inter-lote. Em ambos os casos, a correlação soro a soro relativamente às bandas específicas é excelente.

Interferências

Embora não tenha sido observada nenhuma reação cruzada especial com soro hemolizado, icterico ou lipídico, é recomendado interpretar os resultados da utilização deste tipo de amostras com cuidado.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

"As bandas estão pálidas, com pouco contraste": Certos soros com baixas concentrações de anticorpos podem dar este tipo de resultados.

"São visíveis áreas sombreadas, mais ou menos coloridas, ligeiramente difusas": A tira não foi totalmente mergulhada num dos reagentes e não incubou corretamente ao longo de todo o seu comprimento. Também podem ocorrer manchas nos locais onde a amostra foi depositada se o tabuleiro não tiver sido agitado após a distribuição.

"O ruído de fundo é significativo, tornando a leitura muito difícil": As lavagens foram insuficientes ou a última incubação foi demasiado longa. Assegurar boas técnicas de desempenho do teste, respeitar os tempos de lavagem e assegurar a boa qualidade da água. Reduzir o tempo da última incubação. Excepcionalmente, alguns soros poderão reagir de modo inespecífico. Neste caso, o resultado do imunoblot não pode ser utilizado. Este ruído de fundo inespecífico pode envolver apenas parte da tira, invalidando a interpretação dos resultados apenas para aquela porção.

"**Aparece um precipitado na solução durante o último passo da revelação**": o substrato pode, efetivamente, precipitar parcialmente (flocos pretos) no tampão no final da revelação. Este fenómeno não altera a qualidade da revelação, que deve ser continuada normalmente. A última lavagem com água destilada elimina as eventuais partículas sólidas presentes.

BIBLIOGRAFIA

- Denning, David W., Kostantinos Riniotis, Richard Dobrashian, et Helen Sambatakou. 2003. « Chronic Cavitary and Fibrosing Pulmonary and Pleural Aspergillosis: Case Series, Proposed Nomenclature Change, and Review ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 37 Suppl 3 (octobre): S265-80. doi:10.1086/376526.
- De Pauw, Ben, Thomas J. Walsh, J. Peter Donnelly, David A. Stevens, John E. Edwards, Thierry Calandra, Peter G. Pappas, et al. 2008. « Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 (12): 1813-21. doi:10.1086/588660.
- Hohl, Tobias M., et Marta Feldmesser. 2007. « Aspergillus Fumigatus: Principles of Pathogenesis and Host Defense ». *Eukaryotic Cell* 6 (11): 1953-63. doi:10.1128/EC.00274-07.
- Oliva, A., P. Flori, C. Hennequin, J.-C. Dubus, M. Reynaud-Gaubert, D. Charpin, J. M. Vergnon, et al. 2015. « Evaluation of the Aspergillus Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 53 (1): 248-54. doi:10.1128/JCM.02690-14.
- Persat F, Hennequin C, et Gangneux JP. 2016. « Aspergillus antibody detection: diagnostic strategy and technical considerations from the Société Française de Mycologie Médicale (French Society for Medical Mycology) expert committee ». *Medical Mycology*, 2017, 55, 302–307 doi: 10.1093/mmy/myw078.
- Persat, F. 2012. « [Aspergillus serology, from yesterday to today for tomorrow] ». *Journal De Mycologie Médicale* 22 (1): 72-82. doi:10.1016/j.mycmed.2012.01.004.
- Zmeili, O. S., et A. O. Soubani. 2007. « Pulmonary Aspergillosis: A Clinical Update ». *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians* 100 (6): 317-34. doi:10.1093/qjmed/hcm035.

NOTIFICAÇÃO DE ACTUALIZAÇÃO - Por favor, leia atentamente

DATA DE LANÇAMENTO	VERSÃO	RESUMO DA MODIFICAÇÃO
10/08/2021	Vs 13	Remoção do aviso de segurança R5 - Endereço de e-mail de contacto – Biblio - EUH 032 (NaN3)
30/11/2022	Vs14	Novo endereço
	Vs15	R6 sem NaN3. Tira identificada pela letra. Possível utilização de reagentes de diferentes lotes.



NF EN ISO 13485

24 Av. Joannes MASSET – 69009 LYON – FRANCE
 Tel : +33(0)4 7883 3487 – Fax : +33(0)4 7883 3430
www.ldbiodiagnostics.com – info@ldbiodiag.com