

BIO-RAD

40080-PI10

承認番号: 21000AMY00162000

アスペルギルスキット
プラテリア® アスペルギルス
 (PLATELIA® ASPERGILLUS EIA)

使用に際してはこの添付文書をよくお読みください。
 また、必要な時に読めるように保管しておいてください。

■ 全般的な注意

1. 本品は、体外診断用医薬品ですので、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 添付文書に記載の使用方法に従ってください。それ以外の使用で得られたデータについては保証を致しかねます。
3. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
4. 陰性コントロール(R3)、カットオフ値用コントロール(R4)及び陽性コントロール(R5)には、ヒト由来成分が含まれており、感染の危険がありますので感染性のあるものとして取り扱ってください。
5. 使用する機器の添付文書及び取扱い説明書をよく読んでから使用してください。

■ 形状・構造等(キットの構成)

ラベル	試薬	性状	規格	主要成分
R1	固相マイクロプレート	マイクロプレート	1枚 (96ウェル)	抗ガラクトマンナン(ラット)モノクローナル抗体
R2	洗浄原液	液状	100mL×1本	トリス緩衝液
R3	陰性コントロール	凍結乾燥品	1mL用×3本	陰性ヒト血清
R4	カットオフ値用コントロール	凍結乾燥品	1mL用×3本	精製ガラクトマンナン添加陰性ヒト血清
R5	陽性コントロール	凍結乾燥品	1mL用×3本	精製ガラクトマンナン添加陰性ヒト血清
R6	酵素標識抗体	液状	8mL×1本	ペルオキシダーゼ標識抗ガラクトマンナン(ラット)モノクローナル抗体
R7	検体処理液	液状	10.5mL×1本	EDTA
R8	基質緩衝液	液状	60mL×1本	0.009%過酸化水素水
R9	発色剤	液状	1mL×1本	テトラメチルベンジジン
R10	反応停止液	液状	12mL×1本	0.75mol/L 硫酸

付属品：粘着フィルム 8枚

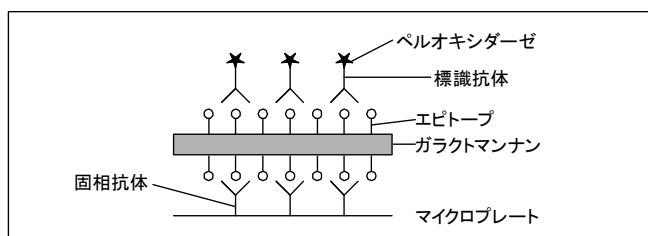
マイクロプレートのプラスチック枠には、試薬の名称(英語)と識別番号が印字されています。識別番号は各ストリップの端にも印字されています。本品の識別番号は「29」です。

■ 使用目的

血清中のアスペルギルス抗原の検出(アスペルギルス感染の診断の補助)

* ■ 測定原理

酵素免疫測定法(ELISA法)



■ 操作上の注意

1. 測定検体の性質、採取法

- 1) 本品による測定は、血清を使用してください。
- 2) 採取した検体は栓を締め、空気に触れないようにして保存してください。栓を未開封の場合、2~8℃で5日間保存できます。それ以降は、-20℃以下で凍結保存してください。但し、5週間より長期間保存する場合は、-70℃以下で凍結保存するようにしてください。
- 3) 凍結・融解の繰り返しは、4回まで可能です。
- 4) 冷蔵または凍結保存されていた検体は、室温に戻しよく混和してから使用してください。
- 5) 微生物汚染、著しい溶血、また高脂血清は、測定値に影響を及ぼす場合がありますので、使用しないでください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

ヘモグロビン500mg/L、ビリルビン20mg/L、トリオレイン2g/Lを含有する検体において、測定値に対する影響は認められませんでした。

3. 操作上の留意事項

- 1) 空気中に存在するアスペルギルスによる汚染を避けるため、ほこりの多い場所や空調の排気口付近では測定を実施しないでください。また、検体や試薬容器の蓋を開けたまま放置しないようにしてください。
- 2) 検体の前処理はガラクトマンナンを抽出するのに重要な操作ですので、確実に行ってください。
- 3) 検体と検体処理液の混和は測定結果に影響しますので、数秒間確実に行ってください。
- 4) 水浴を使用する際は、水がマイクロチューブ内に入らないよう注意してください。
- 5) マイクロプレートの洗浄は大切な操作ですので、確実に行ってください。但し、ウェルの内面をこすらないように注意してください。
- 6) 調製後の基質発色液(R8+R9)は無色透明です。調製後すぐに青色が認められた場合には使用せずに再度調製を行ってください。

■ 用法・用量(操作方法)

試薬は室温に戻してから使用してください。

** 1. 試薬の調製法

試薬	調製法	有効期間
R1 固相マイクロプレート	検体数に応じて必要数を取り出し、残りは袋に戻して密封保存します。前洗浄は不要です。	開封後、 2~8℃/5週間
R2+精製水 洗浄液	洗浄原液(R2)を精製水で10倍に希釈し、洗浄液とします。	調製後、 2~8℃/2週間
R3 陰性コントロール R4 カットオフ値用コントロール R5 陽性コントロール	1mLの精製水を加え、2~3分攪拌し溶解します。各コントロールは測定直前に溶解し、検体と同様に前処理を行います。	用時調製。前処理後は、その日のうちに使用しない分は300μLずつチューブに分注し、直ちに-20℃で凍結保存してください。凍結後は、-20℃で5週間保存できます。
R8+R9 基質発色液	発色剤(R9)を基質緩衝液(R8)で51倍に希釈し、基質発色液とします。	調製後、暗所、 18~25℃/6時間

2. 必要な器具・試薬

- 1) 精製水
- 2) マイクロピペット(50~1,000μL)
- 3) マイクロチューブ(キャップ付き)[検体前処理用]
- 4) メスシリンダー(10~1,000mL)
- 5) インキュベーターまたは恒温槽(100℃:検体処理用、37℃:プレート用)
- 6) 遠心機(10,000G)
- 7) マイクロプレートリーダー(主波長450nm、副波長620nm)
- 8) マイクロプレートウォッシャー
- 9) チューブミキサー

- 10) 吸水紙
- 11) 使い捨て手袋
- 12) 廃液処理容器／廃液処理液

3. 測定操作法

- 1) 検体及び各コントロールの前処理
 - * ① 血清(検体)及び陰性コントロール(R3)、カットオフ値用コントロール(R4)、陽性コントロール(R5)の各300 µLを各マイクロチューブに入れます。
 - * ② ①に検体処理液(R7)100 µLを各々に加え、よく混和します。
 - * ③ 100°Cで3分間加熱処理します。マイクロチューブのキャップは、加熱中に開かないようしっかりと閉めてください。また、チューブやキャップに穴を開けないでください。
 - * ④ 遠心分離(10,000G/10分間)を行い、上清を分離し以下の測定に使用します。前処理後の検体は、上清を分離し2~8°Cで48時間保存することができます。但し、再測定が必要な場合には前処理から行ってください。
- 2) 測定操作
 - * ① 測定開始前に各コントロール及び検体を分注するマイクロプレートの位置を決めてください。
 - * ② 洗浄原液(R2)を精製水で10倍に希釈し、洗浄液とします。
 - * ③ マイクロプレートは必要な数のウェルを袋から取り出し、残りは袋に密封保存します。
 - * ④ 以下の順序で分注します。酵素標識抗体(R6)は使用前に混和し、均一にしてから使用してください。
 - ・酵素標識抗体(R6) 50 µL
 - ・検体前処理後の上清 各50 µL
 酵素標識抗体を分注後、各コントロールを検体と同様に分注してください。ウェルの個数は最低限の数を示しています。
 - ・陰性コントロール(R3) : 1ウェル
 - ・カットオフ値用コントロール(R4) : 2ウェル
 - ・陽性コントロール(R5) : 1ウェル
 - ⑤ マイクロプレートを粘着フィルムでシールします。
 - ⑥ 37°Cで90±5分間反応させます。
 - ⑦ 粘着フィルムを取り除き、洗浄液(370 µL以上)で5回洗浄します。吸水紙の上でマイクロプレートを逆さにして叩き、ウェル内に残った洗浄液を除きます。
 - ⑧ 調製済みの基質発色液(R8+R9)200 µLを各ウェルに手早く分注した後、18~25°C、暗所で30±5分間反応させます。粘着フィルムは使用しないでください。
 - ⑨ 反応停止液(R10)100 µLを各ウェルに加え、よく混和して反応を停止させます。基質発色液を分注した際と同じ順序と速さで行ってください。
 - ⑩ 反応停止後30分以内に、各ウェルの吸光度を主波長450nm/副波長620nmにて測定します。但し、吸光度測定前のプレートは遮光保存してください。

4. 測定系の確認

陰性コントロールの吸光度をA、カットオフ値用コントロールの平均吸光度をB、陽性コントロールの吸光度をCとし、以下の条件に適合するかどうか確認してください。適合する場合、その測定は有効です。適合しない場合には、再測定してください。再測定は前処理から行ってください。

- 1) カットオフ値用コントロールの平均吸光度(B)が0.3~0.8の範囲内である。
- 2) 陽性コントロールの吸光度(C)をカットオフ値用コントロールの平均吸光度(B)で割ったときの値が2.0より大きい。
 $C \div B > 2.0$
- 3) 陰性コントロールの吸光度(A)をカットオフ値用コントロールの平均吸光度(B)で割ったときの値が0.4より小さい。
 $A \div B < 0.4$

■測定結果の判定法

1. 判定

- 1) カットオフ値の計算
カットオフ値用コントロール(R4)の平均吸光度をカットオフ値(C.O.)とします。

- 2) カットオフインデックス(C.O.I.)の計算
各検体のカットオフインデックス(C.O.I.)は、以下のようして計算します。

$$C.O.I. = \frac{\text{検体の吸光度(OD)}}{R4\text{の平均吸光度(C.O.)}}$$

- 3) 判定法
得られたカットオフインデックス(C.O.I.)より、次の表に従い判定します。カットオフインデックス(C.O.I.)=0.5は、検体中のガラクトマンナン0.5ng/mLに対応します。

C.O.I.	判定
C.O.I. ≥ 0.5	陽性
C.O.I. < 0.5	陰性

2. 判定上の注意

- 1) 侵襲性アスペルギルス症の診断は、本品の判定結果のみではなく、臨床症状や培養検査、病理学的検査、画像診断などの結果を加味し、総合的に行ってください。
- 2) 陽性と判定された場合には、同検体における再測定、および再度採血を行った検体にて再測定を実施することをお勧めします。
- 3) 臨床症状がなく陽性と判定された場合、次の状況が考えられます。
 - ① 感染初期に、臨床症状や画像所見等よりも先に、アスペルギルス抗原(ガラクトマンナン)が陽性となることがあります。
 - ② ガラクトマンナンは豆や種子等に多く含まれており、食物繊維としても種々の食物に添加されています^{1), 2)}。また、わが国では多くの食品(味噌、醤油など)でコウジカビ(アスペルギルス属)を利用しています。乳幼児や消化管粘膜に損傷のある患者では食物の影響により陽性を示す可能性があるとの報告がありますので、注意して診断してください^{3), 4)}。
 - ③ 海外でピペラシリン/タゾバクタムの合剤の投与により、本品の測定結果が陽性を示したという報告があります^{1), 5)}。従って、上記薬剤で治療されている患者においては判定の際に注意が必要です。
 - ④ ペニシリウム属等の菌種では交差反応性が認められます⁶⁾。また、*Penicillium marneffei*による侵襲性真菌症の患者検体が本品で陽性となったとの報告があります⁷⁾。
- 4) 抗真菌薬の投与を受けている患者では、検体のガラクトマンナン濃度が低くなる場合があります。
- 5) 慢性肉芽腫症の患者では、検体のガラクトマンナン濃度が低かったとの報告があります⁸⁾。
- 6) 陰性と判定された場合でも、侵襲性アスペルギルス症の可能性は否定できません。検体中の抗原濃度が、本品で検出できる濃度に達していなかった可能性もあります。感染が疑われる場合には、再測定を実施することをお勧めします。
- 7) 自己免疫疾患患者の血清では、非特異反応が起こりうるため、測定結果に基づく診断は他の検査結果や臨床症状等を加味して総合的に判断してください。

■臨床的意義

本品は、アスペルギルス感染の診断の補助に用います。アスペルギルス感染症の中でも、侵襲性アスペルギルス症は最も重篤な病態の一つであり、早期診断が必要とされています。本品は、血清中のアスペルギルス細胞壁の成分であるガラクトマンナンを検出する試薬であり、侵襲性アスペルギルス症における早期診断の補助として有用です。

■性能

* 1. 性能

「測定操作法」に記載の操作方法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行った場合、下記の規格に適合します。

- 1) 感度試験
陰性コントロールを試料とした場合の吸光度は、0.250未満である。陽性コントロールを試料とした場合の吸光度は、1.000以上である。

2) 正確性試験

陰性コントロール及び陽性コントロールを試料とした場合、陰性コントロールは陰性に、陽性コントロールは陽性にそれぞれ判定される。

3) 同時再現性試験

同一管理血清を同時に3回測定する時、すべて同一の判定結果を示す。

管理用物質

ここで用いる陰性コントロール(吸光度:0.250未満)及び陽性コントロール(吸光度:1.000以上)はキットの構成試薬である。また、管理血清もこれらのコントロール類である。

2. 最小検出感度

本品の検出感度は精製ガラクトマンナン量として0.5ng/mLです。

3. 相関性

50検体において本品と対照品(ラテックス凝集法)の相関性を検討した結果は以下のとおりです。使用検体は、自社管理陰性検体及びアスペルギルス症が確認されている患者検体、それぞれ25検体です。

		対 照 品		合 計
		陽 性	陰 性	
本 品 (旧判定基準)	陽 性	24	1 ^{a)}	25
	判定保留	0	1 ^{b)}	1
	陰 性	0	24	24
合 計		24	26	50

一致率:96%(48/50)

- 本品の感度が、対照品より高いことによるものと考えられます。(本品:1ng/mL旧判定基準、対照品:15ng/mL)。
- 陰性血清ですが、本品の非特異反応によるものと考えられます。

但し、本検討は判定基準変更前に実施しているため、旧判定基準に基づき得られた結果です。

(旧判定基準)

C.O.I.の範囲	判 定
C.O.I. \geq 1.5	陽 性
1 \leq C.O.I. < 1.5	判定保留
C.O.I. < 1	陰 性

■使用上又は取扱い上の注意

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 検体はHBV、HCV、HIVなどの感染の恐れがあるものとして取扱ってください。検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングを行わないでください。
- 陰性コントロール(R3)、カットオフ値用コントロール(R4)及び陽性コントロール(R5)を調製するために使用した陰性ヒト血清は、HBs抗原、HIV-1抗体、HIV-2抗体及びHCV抗体の検査を行い、陰性の結果を得ています。しかしながら、ヒト由来成分が含まれておりますので感染性のあるものとして、検体同様十分に注意して取扱ってください。
- 試薬が誤って皮膚に触れたり、目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

- 試薬は凍結しないように注意してください。保存する場合は、指定の貯蔵方法に従って保存してください。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- 本品は正確な結果が得られるように調製してありますので、ロットの異なる試薬と組み合わせて使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- 検体中にはHBV、HCV、HIVなどが存在する場合がありますので、使用した器具(ピペット、試験管など)及び廃液は、次亜塩素酸ナトリウム液(有効塩素濃度1,000ppm以上、1時間以上浸漬)、グルタルアルデヒド(2%、1時間以上浸漬)などによる消毒のほか、オートクレーブ処理(121℃、20分)による滅菌や焼却などの処理を行ってください。
- 検体または検体を含む溶液が飛散した場合は下記の方法を参考にして処理してください。
 - アルカリ性溶液が飛散した場合は、飛散した部分を次亜塩素酸ナトリウム液(有効塩素濃度1,000ppm以上)で消毒した後拭き取り、廃棄バッグに入れて決められた指針に従って廃棄してください。
 - 酸性溶液が飛散した場合は、重炭酸ナトリウムなどを用いて中和させた後、同様に次亜塩素酸ナトリウム液を用いて処理してください。
- 洗浄原液(R2)及び酵素標識抗体(R6)は0.01%のチメロサルを含有していますので、廃液の処理には十分注意してください。
- 試薬及び容器等を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って、医療廃棄物または産業廃棄物等、区別して処理してください。

■貯蔵方法・有効期間

1. 貯蔵方法

2~8℃で、凍結を避けて保存してください。

2. 有効期間

12ヵ月
(使用期限は外箱ラベルに記載されています)

■包装単位

1キット:96ウェル(1プレート)

■主要文献

- Ansorg, R., et al. Detection of Aspergillus galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*, 40:353-357, 1997
- Letscher-Bru, V., et al. Recherche d'antigene galactomannane aspergillaire circulant par Platelia Aspergillus: antigenemies positives persistantes en l'absence d'infection. *J. Med. Mycol.*, 8: 112-113, 1998
- Siemann, M., et al. False-positive results in premature infants with the Platelia Aspergillus sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Mycoses*, 41: 373-377, 1998
- Blijlevens, N. M., et al. Aspergillus galactomannan antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl. Infect. Dis.*, 4:64-65,2002
- Sulahian, A., et al. False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam. *N. Engl. J. Med.*, 349(24):2366-2367, 2003
- Swanink, C. M., et al. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting Aspergillus galactomannan. *J. Clin. Microbiol.*, 35(1):257-260, 1997
- Rimek, D., et al. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in Germany. *Mycoses*, 42(2):25-28, 1999
- Verweij, P. E., et al. Failure to detect circulating Aspergillus markers in a patient with chronic granulomatous disease and Invasive Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.*, 38:3900-3901, 2000
- Martens, J., et al. Prospective clinical evaluation of lower cut-offs for galactomannan detection in adult neutropenic cancer patients and haematological stem cell transplant recipients. *Br. J. Haematol.*, 126:852-860. 2004
- Marr, K. A., et al. Detection of galactomannan antigenemia by enzyme immunoassay for the diagnosis of invasive Aspergillosis: Variables that affect performance. *J. Infect. Dis.*, 190:641-649, 2004

- 11) Kawazu, M., et al. Prospective comparison of the diagnostic potential of real-time PCR, double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for galactomannan, and a (1→3)-β-D-glucan test in weekly screening for invasive aspergillosis in patients with hematological disorders. J. Clin. Microbiol., 42: 2733-2741, 2004
- 12) 堀口祐司、侵襲性アスペルギルス症の早期診断におけるβ-グルカン測定およびガラクトマンナン抗原測定法の有用性. 感染症学雑誌78: 566-573, 2004
- 13) Stynen, D., Boris, A. Sarfati J. and Latge J.P. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol., 33(2): 497-500, 1995
- 14) Verweij, P.E., Stynen, D., Rijs, A.J.M.M., De Pauw, B. E., Hoogkamp-Korstanje, J.A.A., and Meis, J.F.G.M. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. J. Clin. Microbiol., 33(7): 1912-1914, 1995
- 15) Sulahian, A., Taboulet, M., Ribaud, P., Sarfati, J., Gluckman, E., Latge, J.P. and Derouin, F. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 15 (2):139-145, 1996
- 16) Rohrlich, P., Sarfati, J., Mariani, P., Duval, M., Carol, A., Saint-Martin, C., Bingen, E., Latge, J.P. and Vilmer, E. Prospective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. Pediatr. Infect. Dis.J., 15(3):232-237, 1996
- 17) Verweij, P. E., Donnelly, J. P., De Pauw, B. E. and Meis, J.F.G. M. Prospects for the early diagnosis of invasive aspergillosis in the immunocompromised patient. Reviews in Medical Microbiology, 7: 105-113, 1996
- 18) Verweij, P.E., Dompeling, E.C., Donnelly, J.P., Schattenberg, A.V.M.B. and Meis, J.F.G.M. Serial monitoring of Aspergillus antigen in the early diagnosis of invasive aspergillosis. Preliminary investigations with two examples. Infection, 24(6):1-4, 1996
- 19) 木下承皓他、侵襲性Aspergillus症におけるガラクトマンナン enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)の評価. 医学検査, 48: 995-999, 1999
- 20) 長坂陽子他、Sandwich enzyme-linked immunosorbent assayによるアスペルギルス症診断の有用性に関する検討. 日本臨床微生物学雑誌9:137-144. 1999
- 21) 見手倉久治他、「プラテリア アスペルギルス」の臨床有用性についての検討. 医学と薬学, 42:207-212, 1999

プラテリア® アスペルギルス: 操作法

1) 検体及び各コントロールの前処理

検体、各コントロール(300 μL)及び
検体処理液(100 μL)を混和

↓

加熱処理(100℃、3分)

↓

遠心分離(10,000G、10分)

↓

上清を以下の測定に使用する

2) 測定操作

洗浄液の調製

↓

酵素標識抗体(50 μL)及び
検体、コントロール類(50 μL)添加

↓

インキュベーション(37℃、90分)

↓

プレートの洗浄
内容物の吸引除去、洗浄液の添加(計5回)

↓

基質発色液の添加(200 μL)
①基質発色液の調製
②基質発色液 200 μL 添加

↓

インキュベーション(18~25℃、暗所、30分)

↓

反応停止液の添加(100 μL)

↓

吸光度の測定: 450nm/620nm 反応停止後 30分以内

■ 問い合わせ先

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 診断薬事業部
〒140-0002
東京都品川区東品川2-2-24 天王州セントラルタワー
TEL: 0120-925-046
FAX: 03-5463-8481

* 製造販売元
BIO-RAD バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社
東京都品川区東品川 2-2-24
TEL: 03-6361-7070