

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Test immunoenzymatique pour le diagnostic de l'aspergillose à *Aspergillus fumigatus*

96 tests sur barrettes sécables destinés à un usage *in vitro*

Instructions d'utilisation pour l'article N° 6100
N° CE: CH-201301-0006



Utilisations prévues du produit:

Diagnostic sérologique (IgG) de l'aspergillose.
Suivi de patients à risque d'infection aspergillaire.

Principe du test et présentation:

La trousse contient le matériel nécessaire pour effectuer 96 tests immuno-enzymatiques (tests ELISA) sur des barrettes sécables sensibilisées avec le mélange suivant:

- antigènes soluble somatique et métabolique d'*Aspergillus fumigatus*
- Antigènes recombinants : dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsine) et ribonucléase (mitogilline) d'*Aspergillus fumigatus*

La présence d'anticorps sériques spécifiques vis-à-vis des antigènes fongiques est détectée avec un conjugué protéine A - phosphatase alcaline. Les barrettes sécables en puits individuels permettent de tester économiquement de petites séries d'échantillons.

Matériel contenu dans la trousse (96 tests):

WELL	6100-01	Barrettes sécables sensibilisées avec le mélange d'antigènes d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	puits
DILB	6100-02	Tampon de dilution (concentré 10 x)	50	ml
WASH	6100-03	Solution de lavage (concentrée 10 x)	50	ml
ENZB	6100-04	Tampon de l'enzyme	50	ml
STOP	6100-05	Solution d'arrêt (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Sérum de contrôle négatif	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Sérum de contrôle faiblement positif (seuil)	200	µl
CONTROL +	6100-08	Sérum de contrôle positif	200	µl
CONJ	6100-09	Conjugué protéine A – phosphatase alcaline	300	µl
SUBS	6100-10	Substrat de la phosphatase	20	tablettes
		Réservoir de réactifs pour multipipettes, 25 ml	1	pièce
		Cadre pour les supports de puits	1	cadre

Conservation:

Conserver la trousse entre 2° et 8° C (transport à température ambiante). La date de péremption et le numéro de lot sont imprimés sur le côté de la boîte.

Équipement nécessaire ne se trouvant pas dans la trousse:

Pipettes (μl et ml). Récipients. Tubes pour la dilution des sérums. Bande adhésive pour couvrir les puits pendant les incubations. Eau distillée. Incubateur à 37° C. Lecteur ELISA ajusté à une longueur d'onde de 405 nm.

Préparation des réactifs avant l'usage:

Barrettes sensibilisées: ouvrir le côté du sachet d'aluminium 6100-01 et retirer le nombre de puits nécessaires. Placer les puits dans un support. Si nécessaire, compléter les positions inutilisées du support avec des puits usagés. Placer le support dans un cadre en respectant son orientation. Conserver les barrettes inutilisées scellées dans le sachet avec le dessicatif.

Tampon de dilution: diluer le tampon de dilution concentré 10 x 6100-02, 1/10 dans de l'eau distillée.

Solution de lavage: diluer la solution de lavage concentrée 10 x 6100-03, 1/10 dans de l'eau distillée. Si vous désirez utiliser votre propre solution de lavage, évitez les tampons contenant du phosphate qui pourrait inhiber par la suite l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline.

Sérums de contrôles négatif, faiblement positif (seuil) et positif: diluer 10 μl de chaque sérum de contrôle 6100-06 à -08 dans 190 μl de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/20).

Sérums à tester: diluer 10 μl de sérum dans 2.0 ml de la solution de tampon de dilution (dilution finale: 1/201).

Conjugué protéine A – phosphatase alcaline: diluer le conjugué 6100-09, 1/51 dans la solution de tampon de dilution.

Solution de substrat: équilibrer le tampon de l'enzyme 6100-04 à température ambiante. Avant l'addition du substrat de la phosphatase aux puits ELISA, dissoudre le nombre nécessaire de tablettes de substrat 6100-10 dans le tampon de l'enzyme 6100-04 non dilué (une tablette dans 2.5 ml de tampon). Vortexer jusqu'à dissolution complète de la tablette.

Solution d'arrêt: utiliser le réactif 6100-05 non dilué.



Précautions d'utilisation: Les solutions 6100-02, 6100-03, 6100-04 et 6100-09 contiennent respectivement 0.1%, 0.05%, 0.01% et 0.1% d'azide de sodium (NaN_3). La solution 6100-02 contient 0.02% de merthiolate. Ces substances sont toxiques. La solution d'arrêt 6100-05 (0.5 M K_3PO_4) est irritante.

Les sérums de contrôles négatif, faiblement positif et positif (6100-06 à -08) proviennent de lapins.

Volumes à préparer:

			Nombre de puits à utiliser			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampon de dilution (10 x)	6100-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavage (10 x)	6100-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugué	6100-09 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sérums de contrôles	6100-06 à -08 + tampon de dilution	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sérums à tester	Serum + tampon de dilution	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Solution de substrat	6100-10 + 6100-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Méthode:

Etape 1: Blocage:

Remplir complètement les puits avec la solution de tampon de dilution.

Incuber 5 à 15 minutes à température ambiante (blocage des puits).

Éliminer le tampon de dilution par aspiration ou en secouant les barrettes en dessus d'un évier.

Etape 2: Incubation avec les échantillons de sérum:

Remplir le premier puits de la première barrette avec 100 µl de tampon de dilution (blanc en absence de sérum).

Remplir les trois puits suivants avec 100 µl des sérums contrôles dilués (sérum négatif, faiblement positif (seuil) et positif).

Remplir les autres puits avec les sérums à tester dilués (100 µl).

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer les sérums et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 3: Incubation avec le conjugué:

Distribuer 100 µl du conjugué protéine A - phosphatase dilué dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Éliminer le conjugué et laver 4 x avec la solution de lavage.

Etape 4: Incubation avec le substrat:

Distribuer 100 µl de la solution de substrat dans chaque puits.

Couvrir les puits avec de la bande adhésive et incuber 30 minutes à 37° C.

Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl de la solution d'arrêt à chaque puits.

Etape 5: Mesure de la densité optique:

Essuyer le dessous des puits, éliminer les bulles éventuelles et mesurer la densité optique (Absorbance) à une longueur d'onde de 405 nm.

Interprétation:

Soustraire la valeur du blanc en absence de sérum de toutes les autres valeurs. Le test est valable si les trois critères suivants sont remplis: DO contrôle positif > 1.200, DO contrôle négatif < 10% du contrôle positif, DO du blanc contre l'air < 0.350.

La concentration en anticorps du sérum seuil 6100-07 a été ajustée de manière à permettre une distinction optimale entre les sérums de cas cliniques d'aspergillose de patients immunocompétents et les sérums de sujets sains.

L'index cut off de chaque échantillon est défini, après soustraction du blanc en absence de sérum, par la formule suivante:

$$\text{Index} = \frac{\text{DO échantillon}}{\text{DO sérum seuil}}$$

Le résultat est **négatif** lorsque l'index du sérum à tester est inférieur à **0,8**. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes d'*Aspergillus fumigatus* n'est pas cliniquement significative.

La **zone grise** correspond à un index situé entre **0,8 et 1.0**. Dans ce cas l'échantillon doit être considéré comme limite, il est alors recommandé de répéter le test avec le même sérum ou avec un nouveau sérum du même patient prélevé 2 à 4 semaines plus tard.

Le résultat est **positif** lorsque l'index du sérum à tester est supérieur à **1.0**. Dans ce cas, la concentration d'anticorps IgG dirigées contre les antigènes d'*Aspergillus fumigatus* est considérée comme cliniquement significative. Ce résultat oriente vers une sensibilisation aspergillaire ou une aspergillose.

Dans tous les cas, les résultats doivent être interprétés en corrélation avec les observations radiocliniques pour chaque patient.

En cas de patients immunodéprimés, il est recommandé de compléter ce test avec un détecteur d'antigène d'*Aspergillus fumigatus* dans le sérum.

Ce test quantitatif et reproductible permet le suivi de l'évolution sérologique d'un même patient.

Sensibilité et spécificité du test:

Une **sensibilité** de **97%** a été obtenue avec 32 sérums de 19 patients atteints de diverses aspergilloses (11 aspergilloses chroniques nécrosantes, 12 aspergillomes, 2 sinusites aspergillaires et 7 aspergilloses broncho-pulmonaire allergique).

Une sensibilité de 22% a été obtenue avec 9 sérums de 5 patients atteints d'aspergillose invasive.

Une **spécificité** de **98%** a été obtenue avec 131 sérums de 67 patients atteints de pathologies respiratoires non aspergillaires (candidose, tuberculose, pneumocystose, cryptococcose, pneumopathies virales ou bactériennes.)

La répétabilité a été évaluée en testant 2 sérums humains dans 24 puits d'une microplaque en un essai unique. La reproductibilité a été évaluée en testant ces 2 échantillons lors de 10 essais différents.

	Répétabilité		Reproductibilité	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
Moyenne (densité optique)	0.352	1.767	0.410	1.985
Ecart-type (densité optique)	0.027	0.069	0.038	0.096
Coefficient de variation (%)	7.6	3.9	9.3	4.8

Références:

Weig, M., Frosch, M., Tintelnot, K., Haas, A., Gross, U., Linsmeier, B. and Heesemann, J. (2001) Use of Recombinant Mitogillin for Improved Serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus* –Associated diseases. J. Clin. Microbiol. **39**, 1721-1730.

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.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.

Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

