

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Enzymimmunoassay zur Diagnose von Aspergillose durch *Aspergillus fumigatus*

96 Tests in einzelnen Wells

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **6100**
EC reg. N°: CH-201301-0006



Anwendungsgebiet:

Serologischer Nachweis (IgG) von Aspergillose.
Nachuntersuchung/ Verlaufskontrolle von Patienten mit dem Risiko einer Aspergillose.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er Mikrotiterplatte, deren Wells mit den folgenden Antigenen beschichtet sind:

- Lösliches *Aspergillus fumigatus* Antigene (somatisch und metabolisch)
- Rekombinantes Antigen: Dipeptidyl - Pepsidase Typ V (Chymotrypsin) und Ribonuklease (Mitogillin) von *Aspergillus fumigatus*

Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Um kleinere Probenserien ökonomisch sinnvoll abarbeiten zu können, enthält die Mikrotiterplatte 12 brechbare Einzelstreifen.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	6100-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Aspergillus fumigatus</i> Antigen	96	Wells
DILB	6100-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
WASH	6100-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	6100-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	6100-05	Stopp Lösung (0.5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negatives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum	200	µl
CONTROL +	6100-08	Positives Kontroll-Serum	200	µl
CONJ	6100-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat	300	µl
SUBS	6100-10	Phosphatase Substrat	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und μl), Messzylinder, Röhrchen zur Probenverdünnung, Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken, destilliertes Wasser, Inkubator - 37°C, ELISA Reader mit Filter: 405 nm.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen 6100-01 entnehmen. Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder- verschließbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 6100-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 6100-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten.

Negatives, schwach-positives (Cut-off) und positives Kontroll-Serum: Je 10 μl der Kontrollseren 6100-06 bis -08 mit 190 μl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt).

Patientenserum: 10 μl Patientenserum mit 2,0 ml Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:201 verdünnt).

Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat: Das Konzentrat 6100-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung 1:51 verdünnt.

Substrat-Lösung: Den Enzympuffer 6100-04 auf Raumtemperatur bringen. Einige Minuten vor der Zugabe des Substrats zu den ELISA-Streifen, die Substrattabletten 6100-10 im Puffer 6100-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen.

Stopp-Lösung: Reagenz 6100-05, gebrauchsfertig.



Warnung: Die Lösungen 6100-02, 6100-03, 6100-04 und 6100-09 enthalten 0,1%, 0,05%, 0,01% und 0,1% Natriumazid (N_3Na). Lösung 6100-02 enthält 0,02% Merthiolat. Diese Substanzen sind giftig. Die Stopp-Lösung 6100-05 (0,5 M K_3PO_4) ist reizend.

Die Kontrollseren wurden aus Kaninchen gewonnen.

Mengen zur Vorbereitung:

			Anzahl der Wells			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Verdünnungspuffer (10 x)	6100-02 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Waschpuffer (10 x)	6100-03 + H_2O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	6100-09 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrollen	6100-06 bis 08 + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Patientenserum	Serum + Verdünnungspuffer	μl + μl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substrat	6100-10 + 6100-04	Tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Durchführung:

Schritt 1: Blocking

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (Blank/Reagenzienleerwert).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit mind. 300 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm messen.

Ergebnis-Auswertung:

Den Wert des Blanks (serumfreier Blank) von allen gemessenen Werten abziehen. Der Test ist valide, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind: Absorption (A) der Positiv-Kontrolle > 1.200, Absorption der negativen Kontrolle < 10% der Absorption der positiven Kontrolle, A des Blank gegen Luft < 0.350.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 6100-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von klinisch dokumentierten Fällen von Aspergillose in immunkompetenten Patienten und normalen humanen Seren.

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption der Patienten Probe}}{\text{Absorption der Cut-off Probe}}$$

Der Cut-off einer Probe ist definiert wie folgt.- Nach Subtraktion des serumfreien Blanks:

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn der Index der analysierten Probe **kleiner als 0.8** ist. In diesem Fall, ist die IgG-Antikörperkonzentration gegen **Aspergillus fumigatus** Antigen nicht aussagekräftig.

Die **Grauzone** umfasst einen Index zwischen **0,8 und 1.0**. In diesem Fall wird die Patientenprobe als grenzwertig eingestuft, diese Serumprobe sollte mit diesem Material wiederholt oder durch eine erneute Abnahme 2-4 Wochen später, nochmals gemessen werden.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn der Index der analysierten Probe größer als **1.0** ist. In diesem Fall, ist die IgG-Antikörperkonzentration gegen **Aspergillus fumigatus** Antigen normalerweise aussagekräftig. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf eine Aspergillose oder eine Aspergillose- Sensibilisierung.

In jedem Fall müssen die Ergebnisse mit den radiologischen Untersuchungen am Patienten übereinstimmen.

Bei immunsupprimierten Patienten wird empfohlen, den Test durch den Nachweis von *A. fumigatus*-Antigen im Serum zu ergänzen.

Dieser quantitative und reproduzierbare Test erlaubt das Follow-up der serologischen Entwicklung für einen Patienten .

Sensitivität und Spezifität:

Eine **Sensitivität** von **97%** wurde bei 32 Seren von 19 Patienten gefunden diese waren erkrankt an verschiedenen Aspergillosen (11 chronisch nekrotisierende Aspergillosen, 12 Aspergillome, 2 Aspergillus Sinusitiden und 7 allergische bronchopulmonale Aspergillosen).

Eine **Sensitivität** von **22%** wurde bei 9 Seren von 5 Patienten gefunden. Diese waren an invasiver Aspergillose erkrankt

Eine **Spezifität** von **98%** wurden bei 131 Seren von 67 Patienten gefunden. Diese waren Nicht-Aspergillus- induzierte- respiratorische Erkrankungen (Kandidose, Tuberkulose, Pneumocystose, Kryptokokkose, virale oder bakterielle Pneumonie.)

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (OD Wert)	0.352	1.767	0.410	1.985
Standardabweichung (OD Wert)	0.027	0.069	0.038	0.096
Variationskoeffizient (%)	7.6	3.9	9.3	4.8

Referenzen:

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., Debeauvais, 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

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

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

