

# ASPERGILLUS FUMIGATUS

## Test immunoenzimatico per la diagnostica della aspergillosi

96 tests su astine separabili destinate ad uso **in vitro**

Istruzioni d'uso per l'articolo N° **6100**

N° CE: CH-201301-0006



### Usso previsto del prodotto:

Diagnosi sierologica (IgG) della aspergillosi.

Follow up di pazienti a rischio di infezione aspergillare.

### Principio del test e presentazione:

Il kit contiene il materiale necessario per effettuare 96 test immuno-enzimatici (test ELISA) su pozzetti sensibilizzati con la miscela :

- miscela di antigeni somatici e metabolici di *Aspergillus fumigatus*.
- antigeni ricombinanti tipo dipeptidylpeptidase V (chimotripsina) e ribonucleasi (mitogillin) da *Aspergillus fumigatus*

La presenza di anticorpi sierici specifici rispetto agli antigeni parassitari è evidenziata mediante un coniugato proteina A-fosfatasi alcalina. I pozzetti sono suddivisi in astine separabili, che permettono di testare economicamente piccole serie di campioni.

### Materiale contenuto nel kit (96 tests):

<b>WELL</b>	6100-01	Pozzetti sensibilizzati con la miscela di antigeni di <i>Aspergillus fumigatus</i> , su astine separabili	96	pozzetti
<b>DILB</b>	6100-02	Tampone di diluizione (concentrato 10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	6100-03	Soluzione di lavaggio (concentrata 10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	6100-04	Tampone dell' enzima	50	ml
<b>STOP</b>	6100-05	Soluzione d'arresto (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	6100-06	Siero di controllo negativo	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	6100-07	Siero di controllo debamente positivo (soglia)	200	µl
<b>CONTROL +</b>	6100-08	Siero di controllo positivo	200	µl
<b>CONJ</b>	6100-09	Coniugato Proteina A - fosfatasi alcalina	300	µl
<b>SUBS</b>	6100-10	Substrato della fosfatasi	20	Compresse
		Riserva di reattivi per multipipette, 25 ml	1	Pezzo
		Quadro di sostegno per il contenitore dei pozzetti	1	Quadro

### Conservazione:

Conservare il kit tra 2° e 8° C (trasporto a temperatura ambiente). La data di scadenza e il numero del lotto sono stampati sul lato della scatola.

## Materiale necessario non presente nel kit:

Pipette ( $\mu\text{l}$  e ml). Recipienti. Provette per la diluizione dei sieri. Bande adesive per coprire i pozzetti durante le incubazioni. Acqua distillata. Incubatore a  $37^{\circ}\text{C}$ . Lettore ELISA tarato ad una lunghezza d'onda di 405 nm.

## Preparazione dei reagenti prima dell'uso:

**Pozzetti sensibilizzati:** aprire il lato del sacchetto d'alluminio 6100-01 e ritirare il numero necessario di pozzetti. Mettere i pozzetti in un supporto. Se necessario, completare le posizioni non utilizzate del supporto con dei pozzetti già usati. Mettere il supporto in un quadro rispettando il suo orientamento. Conservare le astine non utilizzate sigillate nel sacchetto con la sostanza essiccante.

**Tampone di diluizione:** diluire il tampone di diluizione concentrato 10 x 6100-02, 1/10 in acqua distillata.

**Soluzione di lavaggio:** diluire la soluzione di lavaggio concentrata 10 x 6100-03, 1/10 in acqua distillata. Se volete utilizzare la vostra soluzione di lavaggio, evitate i tamponi che contengono fosfato e che potrebbero inibire successivamente l'attività enzimatica della fosfatasi alcalina.

**Sieri di controllo** negativi, debolmente positivi (soglia) e positivi: diluire 10  $\mu\text{l}$  di ogni siero di controllo 6100-06 a -08 in 190  $\mu\text{l}$  della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/20).

**Sieri da testare:** diluire 10  $\mu\text{l}$  di siero in 2.0 ml della soluzione tampone di diluizione (diluizione finale: 1/201).

**Coniugato proteina A - fosfatasi alcalina:** diluire il coniugato 6100-09, 1/51 nella soluzione tampone di diluizione.

**Soluzione di substrato:** equilibrare alla temperatura ambiente il tampone dell'enzima 6100-04. Prima di aggiungere ai pozzetti ELISA il substrato della fosfatasi dissolvere il numero necessario di compresse di substrato 6100-10 nel tampone dell'enzima 6100-04 non diluito (una compressa in 2.5 ml di tampone). Vortexare fino a scioglimento completo della compressa.

**Soluzione d'arresto:** utilizzare il reagente N° 6100-05 non diluito.



**Precauzioni d'uso:** Le soluzioni 6100-02, 6100-03, 6100-04 e 6100-09 contengono rispettivamente 0.1%, 0.05%, 0.01% e 0.1% di azoturo di sodio ( $\text{NaN}_3$ ). La soluzione 6100-02 contiene 0.02% di merthiolato. Queste sostanze sono tossiche. La soluzione d'arresto 6100-05 (0.5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) è irritante.

I sieri di controllo negativo, debolmente positivo e positivo (6100-06 a -08) provengono da conigli.

## Volumi da preparare:

			Numero di pozzetti da utilizzare			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampone di diluizione (10 x)	6100-02 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. di lavaggio (10 x)	6100-03 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Coniugato	6100-09 + tampone di diluizione	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sieri di controllo	6100-06 a -08 + tampone di diluizione	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sieri da testare	Siero + tampone di diluizione	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Soluzione di substrato	6100-10 + 6100-04	comp. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

## **Metodo:**

### **Tappa 1: Bloccaggio:**

Riempire completamente i pozzetti con la soluzione tampone di diluizione.

Incubare tra 5 e 15 minuti alla temperatura ambiente (bloccaggio dei pozzetti).

Eliminare il tampone di diluizione per aspirazione o agitando le astine sopra un lavello.

### **Tappa 2: Incubazione con i campioni di siero:**

Riempire il primo pozzetto della prima astina con 100 µl di tampone di diluizione ("bianco", senza siero).

Riempire i tre pozzetti seguenti con 100 µl dei sieri controllo diluiti (siero negativo, debolmente positivo (soglia) e positivo).

Riempire gli altri pozzetti con i sieri da testare diluiti (100 µl)

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare i sieri e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

### **Tappa 3: Incubazione con il coniugato:**

Distribuire 100 µl del coniugato proteina A - fosfatasi diluito in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Eliminare il coniugato e lavare 4 x con la soluzione di lavaggio.

### **Tappa 4: Incubazione con il substrato:**

Distribuire 100 µl della soluzione di substrato in ogni pozzetto.

Coprire i pozzetti con del nastro adesivo e incubare 30 minuti a 37° C.

Arrestare la reazione aggiungendo a ogni pozzetto 100 µl della soluzione d'arresto.

### **Tappa 5: Misura della densità ottica:**

Asciugare sotto i pozzetti, eliminare le eventuali bolle d'aria e misurare la densità ottica (Assorbimento) alla lunghezza d'onda di 405 nm.

## Interpretazione:

Sottrarre il valore del "bianco" in assenza di siero da tutti gli altri valori. Il test è valido se sono rispettati i tre criteri seguenti : DO del controllo positivo >1.200, DO del controllo negativo < 10% del controllo positivo, DO del "bianco" misurato contro l'aria < 0.350.

La concentrazione di anticorpi del siero soglia 6100-07 è stata aggiustata in modo da permettere una distinzione ottimale tra i sieri di casi clinici di aspergilloso di pazienti immunocompetenti e i sieri di soggetti sani.

L'indice cut off di ogni campione è definito, dopo sottrazione del bianco in assenza di siero, mediante la formula seguente :

$$\text{Indice} = \frac{\text{DO campione}}{\text{DO siero soglia}}$$

Il risultato è **negativo** quando l'indice del siero da testare è inferiore a **0,8**. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni di ***Aspergillus Fumigatus*** non è clinicamente significativa.

La **zona grigia** corrisponde a un range situato tra **0,8 e 1,0**. In questo caso il campione deve essere considerato come borderline, si raccomanda quindi di ripetere il test con lo stesso siero o con un nuovo siero dello stesso paziente prelevato dalle 2 alle 4 settimane seguenti.

Il risultato è positivo quando l'indice del siero da testare è superiore a **1,0**. In questo caso, la concentrazione di anticorpi IgG diretti contro gli antigeni di ***Aspergillus Fumigatus*** è considerata come clinicamente significativa. Questo risultato orienta verso una sensibilizzazione aspergillare o una aspergilloso. In tutti i casi, i risultati devono essere interpretati in correlazione con le osservazioni radiologiche e cliniche di ogni paziente.

Nel caso di pazienti immunodepressi, si raccomanda di completare le indagini con la ricerca di antigeni di ***Aspergillus fumigatus*** nel siero.

Questo test quantitativo e riproducibile permette di seguire l'andamento sierologico in un paziente.

## Sensibilità e specificità del test :

Una **sensibilità** del **97 %** è stata ottenuta con 32 sieri di 19 pazienti affetti da diversi quadri di aspergilloso (11 aspergilloso croniche necrotizzanti, 12 aspergillomi, 2 sinusiti aspergillari e 7 aspergilloso broncho-polmonari allergiche).

Una sensibilità del **22 %** è stata ottenuta con 9 sieri di 5 pazienti affetti da aspergilloso invasiva.

Una **specificità** del **98 %** è stata ottenuta con 131 sieri di 67 pazienti affetti da patologie respiratorie non aspergillari (candidosi, tubercolosi, pneumocistosi, criptococcosi, pneumopatie virali o batteriche.)

La ripetibilità è stata valutata testando 2 sieri umani in 24 pozzetti di una micropiastra in un unico test.

La riproducibilità è stata valutata testando questi 2 campioni in 10 test diversi.

	Ripetibilità		Riproducibilità	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
<b>Media (densità ottica)</b>	0.352	1.767	0.410	1.985
<b>Deviazione-standard (DO)</b>	0.027	0.069	0.038	0.096
<b>Coefficiente di variazione (%)</b>	7.6	3.9	9.3	4.8

## Riferimenti bibliografici:

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**  
Bâtiment Biokema, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Switzerland.  
Phone: + 41 21 633 31 67, Fax: + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

