

# ASPERGILLUS FUMIGATUS

Ενζυμο-ανοσολογική δοκιμή για τη διάγνωση ασπεργίλλωσης από *Aspergillus fumigatus*

96 δοκιμές σε μεμονωμένα φρεάτια

Οδηγίες χρήσης για το προϊόν Αριθ. **6100**  
Κανονισμός ΕΚ Αριθ.: CH-201301-0006



## Προβλεπόμενη χρήση:

Ορολογική διάγνωση (IgG) ασπεργίλλωσης.  
Παρακολούθηση ασθενών με κίνδυνο λοιμώξεων ασπεργίλλωσης.

## Χημικό συστατικό και παρουσίαση:

Το κιτ παρέχει το υλικό που απαιτείται για την εκτέλεση 96 ενζυμικών δοκιμών ανοσοπροσρόφησης (ELISA) σε υποδοχές μικροτιτλοδότησης ευαισθητοποιημένες με τον ακόλουθο συνδυασμό:

- Διαλυτά σωματικά και μεταβολικά αντιγόνα *Aspergillus fumigatus*
- Ανασυνδυασμένα αντιγόνα: διπεπτιδυλικής πεπτιδάσης τύπου V (χυμοθρυψίνη) και ριβονουκλεάση (mitogillin) από *Aspergillus fumigatus*

Η παρουσία αντισωμάτων ορού συγκεκριμένων μυκολικών ανιχνεύεται με σύζευγμα Πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης. Οι ευαισθητοποιημένες υποδοχές παρέχονται ως εύθραυστες ταινίες για την οικονομική δοκιμή μικρών σειρών δειγμάτων.

## Υλικά που περιέχονται στο κιτ (96 δοκιμές)

<b>WELL</b>	6100-01	Εύθραυστες ταινίες ELISA ευαισθητοποιημένες με αντιγόνα <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	φρεάτια
<b>DILB</b>	6100-02	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
<b>WASH</b>	6100-03	Διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα	50	ml
<b>ENZB</b>	6100-04	Ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου	50	ml
<b>STOP</b>	6100-05	Ανασχετικό διάλυμα (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	6100-06	Αρνητικός ορός μάρτυρα	200	μl
<b>CONTROL -/+</b>	6100-07	Ασθενής θετικός ορός (διακοπή)	200	μl
<b>CONTROL +</b>	6100-08	Θετικός ορός μάρτυρα	200	μl
<b>CONJ</b>	6100-09	Σύζευγμα Πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης	300	μl
<b>SUBS</b>	6100-10	Υπόστρωμα φωσφατάσης	20	δισκία
		Δεξαμενή με πολλαπλές πιπέτες, 25 ml	1	τεμάχιο
		Πλαίσιο για υποδοχή 8 φρεατίων ELISA	1	τεμάχιο

## Χρόνος διατήρησης και αποθήκευση:

Αποθηκεύστε το κιτ στους 2° έως 8° C (μεταφορά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος). Η ημερομηνία λήξης και ο αριθμός παρτίδας του κιτ είναι τυπωμένα στο πλάι του κουτιού.

## Εξοπλισμός που απαιτείται ωστόσο δεν παρέχεται με το κιτ:

Πιπέτες (ml και µl). Φιάλες. Σωλήνες για την αραιώση του ορού. Κολλητική ταινία για την κάλυψη φρεατίων κατά τη διάρκεια επωάσεων. Απεσταγμένο νερό. Επωαστήρας ρυθμισμένος στους 37° C. Συσκευή ανάγνωσης ELISA ρυθμισμένη στα 405 nm.

## Προετοιμασία αντιδραστηρίων πριν τη χρήση:

**Φρεάτια ELISA:** ανοίξτε το πλάι του σάκου αλουμινίου 6100-01 και αφαιρέστε τον αριθμό φρεατίων που απαιτούνται. Τοποθετήστε ευαισθητοποιημένα φρεάτια σε υποδοχή(ές) 8 φρεατίων. Εάν είναι απαραίτητο, συμπληρώστε τις κενές θέσεις στην υποδοχή με χρησιμοποιημένα φρεάτια. Εισαγάγετε την υποδοχή(ές) στο πλαίσιο, με το σωστό προσανατολισμό. Σφραγίστε ξανά την ανοικτή συσκευασία με αποξηραντική γάζα.

**Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης:** αραιώστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x) σε συμπύκνωμα 6100-02, 1/10 σε απεσταγμένο νερό.

**Διάλυμα πλύσης:** αραιώστε το διάλυμα πλύσης (10 x) σε συμπύκνωμα 6100-03, 1/10 σε απεσταγμένο νερό. Μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε δικό σας διάλυμα πλύσης. Αποφύγετε ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν φωσφορικό άλας, τα οποία θα μπορούσαν να αναστείλουν την ενζυμική δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης.

**Αρνητικός, ασθενής θετικός (διακοπή) και θετικός ορός μάρτυρα:** αραιώστε 10 µl ορού μάρτυρα 6100-06 έως -08 σε 190 µl ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/20).

**Οροί για δοκιμή:** αραιώστε 10 µl ορού σε 2,0 ml ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/201).

**Σύζευγμα Πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης:** αραιώστε σύζευγμα 6100-09 σε ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (τελική αραιώση 1/51).

**Διάλυμα υποστρώματος:** προθερμάνετε το ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 6100-04 σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Πριν την προσθήκη υποστρώματος στα φρεάτια ELISA, διαλύστε δισκίο(α) υποστρώματος φωσφατάσης 6100-10 σε μη αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 6100-04 (1 δισκίο σε 2,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος). Ανακατέψτε με δίνη μέχρι την πλήρη διάλυση του δισκίου(ων).

**Ανασχετικό διάλυμα:** χρησιμοποιήστε αντιδραστήριο 6100-05 μη αραιωμένο.



**Προειδοποιήσεις και προληπτικά μέτρα:** Τα διαλύματα 6100-02, 6100-03, 6100-04 και 6100-09 περιέχουν αντίστοιχα 0,1%, 0,05%, 0,01% και 0,1% αζίδιο του νατρίου ( $\text{NaN}_3$ ). Το διάλυμα 6100-02 περιέχει 0,02% μερθειολικού. Οι ουσίες αυτές είναι τοξικές. Το ανασχετικό διάλυμα 6100-05 ( $0,5 \text{ M K}_3\text{PO}_4$ ) είναι ερεθιστικό.

Ο αρνητικός, ασθενής θετικός και θετικός ορός μάρτυρα (6100-06 έως -08) είναι από κουνέλια.

## Όγκοι προς προετοιμασία:

			Συνολικός αριθμός φρεατίων προς χρήση			
			3-4	5-6	7-8	9-10
<b>Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης (10 x)</b>	6100-02 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Διάλυμα πλύσης (10 x)</b>	6100-03 + H <sub>2</sub> O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
<b>Σύζευγμα</b>	6100-09 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	µl + µl	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
<b>Ορός μάρτυρα</b>	6100-06 έως -08 + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	µl + µl	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
<b>Οροί προς δοκιμή</b>	Ορός + ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης	µl + µl	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
<b>Διάλυμα υποστρώματος</b>	6100-10 + 6100-04	δισκ. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

## Διαδικασία:

### Βήμα 1: Μονιμοποίηση:

Γεμίστε πλήρως τα φρεάτια με ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης.

Επώαστε για 5 με 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (μονιμοποίηση).

Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης μέσω αναρρόφησης ή τινάζοντας τις ταινίες πάνω από το συλλέκτη.

### Βήμα 2: Επώαση με δείγματα ορού:

Γεμίστε το πρώτο φρεάτιο της πρώτης ταινίας με 100 μl ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης μόνο (χωρίς κενό ορού).

Γεμίστε τα επόμενα τρία φρεάτια με 100 μl αραιωμένου αρνητικό, ασθενή θετικό (διακοπή) και θετικό ορό μάρτυρα αντίστοιχα (100 μl το καθένα).

Γεμίστε τα υπόλοιπα φρεάτια με τους αραιωμένους ορούς προς δοκιμή (100 μl το καθένα).

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε τους ορούς και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

### Βήμα 3: Επώαση με σύζευγμα:

Διανέμετε 100 μl αραιωμένο σύζευγμα πρωτεΐνης A - αλκαλικής φωσφατάσης σε κάθε φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Αφαιρέστε το σύζευγμα και πλύνετε 4 x με διάλυμα πλύσης.

### Βήμα 4: Επώαστε με υπόστρωμα:

Διανέμετε 100 μl διάλυμα υποστρώματος ανά φρεάτιο.

Καλύψτε τα φρεάτια με κολλητική ταινία και επώαστε για 30 λεπτά στους 37°C.

Διακόψτε την αντίδραση με την προσθήκη 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε φρεάτιο.

### Βήμα 5: Μέτρηση απορροφήσεων:

Καθαρίστε τον πυθμένα των φρεατίων, εξαλείψτε τις φυσαλίδες και μετρήστε τις απορροφήσεις στα 405 nm.

## Ερμηνεία

Αφαιρέστε την τιμή του χωρίς κενό ορού από όλες τις μετρηθείσες τιμές. Η δοκιμή είναι έγκυρη εφόσον πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια: απορρόφηση (A) του θετικού μάρτυρα > 1,200, A του αρνητικού μάρτυρα < 10% του A του θετικού μάρτυρα, A κενό έναντι αέρα < 0,350.

Η συγκέντρωση αντισωμάτων του ασθενούς θετικού ορού 6100-07 έχει οριστεί ώστε να διακρίνεται βέλτιστα μεταξύ ορών από κλινικά τεκμηριωμένες περιπτώσεις ασπεργίλλωσης σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς και υγιείς ανθρώπινους ορούς.

Ο δείκτης διακοπής ενός δείγματος ορίζεται, έπειτα από την αφαίρεση του ορού χωρίς κενό, ως:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbance sample}}{\text{Absorbance cut off serum}}$$

Το αποτέλεσμα είναι **αρνητικό** όταν ο δείκτης του αναλυθέντος δείγματος είναι χαμηλότερος από 1. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι αντιγόνων *Aspergillus fumigatus* είναι κλινικώς μη σημαντική.

Μια γκρίζα περιοχή αντιστοιχεί σε δείκτη ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 0,8 και 1. Στην περίπτωση αυτή, το δείγμα θεωρείται οριακό, συνιστάται να επαναληφθεί η δοκιμή με το ίδιο δείγμα ή με νέο ορό του ίδιου ασθενούς, το οποίο θα ληφθεί έπειτα από 2-4 εβδομάδες.

Το αποτέλεσμα είναι **θετικό** όταν ο δείκτης του αναλυθέντος δείγματος είναι υψηλότερος από 1. Στην περίπτωση αυτή, η συγκέντρωση του αντισώματος IgG έναντι αντιγόνων *Aspergillus fumigatus* θεωρείται κλινικώς μη σημαντική. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί σε ασπεργίλλωση ή ευαισθητοποίηση ασπεργίλλωσης.

Σε κάθε περίπτωση, τα αποτελέσματα πρέπει να συσχετισθούν με ακτινο-κλινικές παρατηρήσεις σχετικά με τον ασθενή.

Σε περίπτωση ανοσοκατεσταλμένων ασθενών, συνιστάται να ολοκληρωθεί η εξέταση με την ανίχνευση αντιγόνων *A. fumigatus* σε ορό.

Αυτή η ποσοτική και αναπαραγωγίμη δοκιμή επιτρέπει την παρακολούθηση της ορολογικής εξέλιξης για ένα δεδομένο ασθενή.

## Ευαισθησία και εξειδίκευση της δοκιμής:

Εντοπίστηκε **ευαισθησία 97%** με 32 ορούς από 19 ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από διάφορες ασθένειες ασπεργίλλωσης (11 χρόνια νεκρωτική ασπεργίλλωση, 12 ασπεργίλλωμα, 2 Ιγμορίτιδα ασπεργίλλου και 7 αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση). Εντοπίστηκε ευαισθησία 22% με 9 ορούς από 5 ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από διηθητική ασπεργίλλωση.

Εντοπίστηκε **εξειδίκευση 98%** με 131 ορούς από 67 ασθενείς οι οποίοι πάσχουν από αναπνευστικές παθήσεις μη ασπεργίλλου (καντιντίαση, φυματίωση, πνευμονοκύστωση, κρυπτοκοκκίαση, ιογενή ή βακτηριακή πνευμονία).

Αξιολογήθηκε η επαναληψιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 24 φρεάτια σε 1 δοκιμή.

Αξιολογήθηκε η αναπαραγωγιμότητα μέσω της δοκιμής 2 δειγμάτων ανθρώπινου ορού σε 10 διαφορετικές δοκιμές.

	Επαναληψιμότητα		Αναπαραγωγιμότητα	
	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα 1	Δείγμα 2
Μέσος όρος (τιμή OD)	0,352	1,767	0,410	1,985
Τυπική απόκλιση (τιμή OD)	0,027	0,069	0,038	0,096
Συντελεστής μεταβλητότητας (%)	7,6	3,9	9,3	4,8

## Αναφορές:

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**

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

