

# ASPERGILLUS FUMIGATUS

Ensaio Imunoenzimático para o diagnóstico de aspergilose por *Aspergillus fumigatus*

96 ensaios em poços individuais

Instruções de utilização referentes ao artigo n.º 6100  
N.º reg. CE: CH-201301-0006



## Utilização prevista:

Diagnóstico serológico (IgG) de aspergilose.  
Acompanhamento de doentes em risco de contraírem infeções por aspergilose.

## Princípio e apresentação:

O kit fornece o material necessário para realizar 96 ensaios pela técnica ELISA em poços de microplaca sensibilizados com a seguinte mistura:

- Antígenos somáticos e metabólicos solúveis de *Aspergillus fumigatus*
- Antígenos recombinantes: dipeptidil peptidase tipo V (quimotripsina) e ribonuclease (mitogillina) de *Aspergillus fumigatus*

A presença de anticorpos séricos específicos do parasita é detetada com um conjugado de proteína A - fosfatase alcalina. São fornecidos poços sensibilizados como tiras quebráveis para rentabilizar o ensaio de pequenas séries de amostras.

## Material incluído no kit (96 ensaios):

|                    |         |                                                                                        |     |           |
|--------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------|
| <b>WELL</b>        | 6100-01 | Tiras de ELISA quebráveis sensibilizadas com Antígenos de <i>Aspergillus fumigatus</i> | 96  | poços     |
| <b>DILB</b>        | 6100-02 | Concentrado de tampão de diluição (10 x)                                               | 50  | ml        |
| <b>WASH</b>        | 6100-03 | Concentrado de tampão de lavagem (10 x)                                                | 50  | ml        |
| <b>ENZB</b>        | 6100-04 | Tampão da enzima                                                                       | 50  | ml        |
| <b>STOP</b>        | 6100-05 | Solução de paragem (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )                                   | 25  | ml        |
| <b>CONTROL -</b>   | 6100-06 | Soro de controlo negativo                                                              | 200 | µl        |
| <b>CONTROL -/+</b> | 6100-07 | Soro fracamente positivo (cut off)                                                     | 200 | µl        |
| <b>CONTROL +</b>   | 6100-08 | Soro de controlo positivo                                                              | 200 | µl        |
| <b>CONJ</b>        | 6100-09 | Conjugado de proteína A - fosfatase alcalina                                           | 300 | µl        |
| <b>SUBS</b>        | 6100-10 | Substrato de fosfatase                                                                 | 20  | pastilhas |
|                    |         | Reservatório com várias pipetas, 25 ml                                                 | 1   | unidade   |
|                    |         | Estrutura para suporte de 8 poços ELISA                                                | 1   | unidade   |

## Tempo de conservação e armazenamento:

Armazenar o kit a uma temperatura entre 2 e 8 °C (transportar à temperatura ambiente). A data de validade e o número de lote do kit estão impressos de lado na caixa.

## Equipamento necessário, mas não incluído no kit:

Pipetas (ml e µl). Frascos. Tubos para a diluição de soros. Fita adesiva para cobrir os poços durante incubações. Água destilada. Incubador a 37 °C. Leitor ELISA com filtro de 405 nm.

## Preparação de reagentes antes da sua utilização:

**Poços ELISA:** abrir a parte lateral do saco de alumínio 6100-01 e retirar a quantidade de poços necessários. Colocar os poços sensibilizados em um ou mais suportes para 8 poços. Se necessário, preencha as posições vazias no suporte com poços usados. Insira o(s) suporte(s) na estrutura no sentido correto. Voltar a vedar a embalagem aberta com dessecante.

**Tampão de diluição:** diluir o concentrado de tampão de diluição (10 x) 6100-02, 1/10 em água destilada.

**Solução de lavagem:** diluir o concentrado de solução de lavagem (10 x) 6100-03, 1/10 em água destilada. Também pode utilizar a sua própria solução de lavagem. Evitar tampões com fosfato que possam inibir a atividade enzimática da fosfatase alcalina.

**Soros de controlo** negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos: diluir 10 µl de soros de controlo 6100-06 a -08 em 190 µl de solução tampão de diluição (diluição final 1/20).

**Soros a testar:** diluir 10 µl de soro em 2,0 ml de tampão de diluição (diluição final 1/201).

**Conjugado** de proteína A - fosfatase alcalina: diluir conjugado 6100-09 em solução tampão de diluição (diluição final 1/51).

**Solução de substrato:** pré aquecer o tampão da enzima 6100-04 à temperatura ambiente. Antes da adição de substrato aos poços ELISA, dissolver uma ou mais pastilhas de substrato de fosfatase 6100-10 em tampão não diluído 6100-04 (1 pastilha em 2,5 ml de solução). Agitar em vórtex até à dissolução completa da(s) pastilha(s).

**Solução de paragem:** utilizar reagente 6100-05 não diluído.



**Advertências e precauções:** as soluções 6100-02, 6100-03, 6100-04 e 6100-09 contêm respetivamente 0,1%, 0,05%, 0,01% e 0,1% de azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ). A solução 6100-02 contém 0,02% de mertiolato. Estas substâncias são tóxicas. A solução de paragem 6100-05 (0,5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) é irritante.

Os soros de controlo negativos, fracamente positivos e positivos (6100-06 a -08) são de coelhos.

## Volumes a preparar:

|                                  |                                    |            | Quantidade total de poços a utilizar |           |           |           |
|----------------------------------|------------------------------------|------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                  |                                    |            | 3-4                                  | 5-6       | 7-8       | 9-10      |
| <b>Tampão de diluição (10 x)</b> | 6100-02 + H <sub>2</sub> O         | ml + ml    | 1 + 9                                | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Solução de lavagem (10 x)</b> | 6100-03 + H <sub>2</sub> O         | ml + ml    | 1 + 9                                | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Conjugado</b>                 | 6100-09 + tampão de diluição       | µl + µl    | 10 + 500                             | 15 + 750  | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| <b>Soros de controlo</b>         | 6100-06 a -08 + tampão de diluição | µl + µl    | 10 + 190                             | 10 + 190  | 10 + 190  | 10 + 190  |
| <b>Soros a testar</b>            | Soro + tampão de diluição          | µl + µl    | 10 + 2000                            | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| <b>Solução de substrato</b>      | 6100-10 + 6100-04                  | past. + ml | 1 + 2,5                              | 1 + 2,5   | 1 + 2,5   | 1 + 2,5   |

## **Procedimento:**

### **Passo 1: bloqueio:**

Encher completamente os poços com solução tampão de diluição.

Incubar durante 5 a 15 minutos à temperatura ambiente (bloqueio).

Remover o tampão de diluição por aspiração ou inverter as tiras sobre o lavatório.

### **Passo 2: incubação com amostras séricas:**

Encher apenas o primeiro poço da primeira tira com 100 µl de tampão de diluição (solução branco sem soro).

Encher os três poços seguintes com 100 µl de soros de controlo negativos, fracamente positivos (cut off) e positivos, respetivamente (100 µl cada).

Encher os restantes poços com os soros diluídos a testar (100 µl cada).

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover os soros e lavar 4 x com solução de lavagem.

### **Passo 3: incubação com conjugado:**

Distribuir 100 µl de conjugado de proteína A - fosfatase alcalina diluído em cada poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Remover o conjugado e lavar 4 x com solução de lavagem.

### **Passo 4: incubação com substrato:**

Distribuir 100 µl de solução de substrato por poço.

Cobrir os poços com fita adesiva e incubar durante 30 minutos a 37 °C.

Parar a reação adicionando 100 µl de solução de paragem em cada poço.

### **Passo 5: medição das absorvâncias:**

Limpar o fundo dos poços, eliminar bolhas e medir absorvâncias a 405 nm.

## Interpretação:

Subtrair o valor da solução branco sem soro de todos os valores medidos. O teste é válido se forem cumpridos os seguintes critérios: absorvância (A) de controlo positivo > 1,200, A de controlo negativo < 10 % de A de controlo positivo, A de solução branco contra ar < 0,350.

A concentração de anticorpos do soro fracamente positivo 6100-07 foi definida de modo a discriminar otimamente entre soros de casos clinicamente documentados de aspergilose em doentes imunocompetentes e soros de humanos saudáveis.

O índice de corte (cut off) de uma amostra é definido após a subtração do branco (solução sem soro), o como se segue:

$$\text{índice} = \frac{\text{DO (absorvância) da Amostra}}{\text{DO (absorvância) do cut off}}$$

O resultado é **negativo** quando o índice da amostra analisada é inferior a **1,0**. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos de *Aspergillus fumigatus* é clinicamente não significativa.

Uma zona cinzenta corresponde a um índice entre **0,8** e **1,0**. Neste caso, a amostra está num nível limite. Recomenda-se repetir o teste com a mesma amostra ou com um soro novo do mesmo doente recolhido após duas a quatro semanas.

O resultado é **positivo** quando o índice da amostra analisada é superior a **1,0**. Neste caso, a concentração de anticorpos IgG contra antígenos de *Aspergillus fumigatus* é considerada clinicamente significativa. Este resultado conduz a uma aspergilose ou sensibilização de aspergilose.

Em cada caso, os resultados devem ser correlacionados com observações radioclínicas do doente.

No caso de doentes imunossuprimidos, recomenda-se realizar o teste com deteção de antígenos de *A. fumigatus* em soro.

Este teste quantitativo e reprodutível permite acompanhar a evolução sorológica de um determinado doente.

## Sensibilidade e especificidade do ensaio:

Foi detetada uma **sensibilidade** de **97%** com 32 soros de 19 doentes com várias aspergiloses (11 casos de aspergilose necrotizante crónica, 12 de aspergiloma, 2 de sinusite por aspergillus e 7 de aspergilose broncopulmonar alérgica). Foi detetada uma sensibilidade de 22% com 9 soros de 5 doentes com aspergilose invasiva.

Foi detetada uma **especificidade** de **98%** com 131 soros de 67 doentes com doenças respiratórias não relacionadas com aspergillus (candidíase, tuberculose, pneumocistose, criptococose, pneumonia viral ou bacteriana).

A repetibilidade foi avaliada testando duas amostras séricas humanas em 24 poços num ensaio.

A reprodutibilidade foi avaliada testando as duas amostras séricas humanas em 10 ensaios diferentes.

|                                     | Repetibilidade |           | Reprodutibilidade |           |
|-------------------------------------|----------------|-----------|-------------------|-----------|
|                                     | Amostra 1      | Amostra 2 | Amostra 1         | Amostra 2 |
| <b>Média (valor de DO)</b>          | 0,352          | 1,767     | 0,410             | 1,985     |
| <b>Desvio padrão (valor de DO)</b>  | 0,027          | 0,069     | 0,038             | 0,096     |
| <b>Coefficiente de variação (%)</b> | 7,6            | 3,9       | 9,3               | 4,8       |

## Referências:

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

