

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af aspergillose af *A. fumigatus*

96 analyser på særskilte brønde

Instruktioner for anvendelse af artikel N° 6100

EC reg. N°: CH-201301-0006



Tilsigtet anvendelse:

Serologisk diagnostik (IgG) af aspergillose.
Opfølgning af patienter med risiko for aspergillose infektioner.

Princip og præsentation

Kittet giver det materiale, som er nødvendigt for at udføre 96 Enzymkoblet immunadsorberende analyse (ELISA) på mikrotitreringsbrønde sensibiliserede følgende blanding:

- Opløselige somatiske og metaboliske *Aspergillus fumigatus* antigener.
- Rekombinante antigener: dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsin) og ribonuclease (mitogillin) fra *Aspergillus fumigatus*

Forekomsten af mykosespecifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Sensibiliserede brønde er vedlagt som delbare strimler til omkostningsbesparende analyse af mindre prøveserier.

Materiale, som indgår i kittet (96 prøver):

WELL	6100-01	Delbare ELISA strimler sensibiliserede med <i>Aspergillus fumigatus</i> antigener	96	brønde
DILB	6100-02	Fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	6100-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	6100-04	Enzym buffer	50	ml
STOP	6100-05	Stopløsning (K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negativt kontrolserum	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Svagt positivt serum (afskåret)	200	µl
CONTROL +	6100-08	Positivt kontrolserum	200	µl
CONJ	6100-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat	300	µl
SUBS	6100-10	Fosfatase-substrat	20	tabletter
		Multipipette beholder, 25 ml	1	stykke
		Ramme til ELISA 8-brønd holder	1	stykke

Holdbarhedstid og opbevaring:

Opbevar kittet ved 2 til 8° C (transporter ved omgivende temperatur). Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and μ l). Kolber. Rør til fortynding af sera. Selvklæbende tape til at dække brøndene under inkubationen. Destilleret vand. Inkubator indstillet på 37° C. ELISA læser indstillet på 405 nm.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 6100-01, og tag det nødvendige antal brønde. Sæt sensibiliserede brønde i 8-brønd holder(e). Hvis nødvendigt, udfyld de tomme pladser i holderen med brugte brønde. Indsæt holder(e) i rammen i den rigtige retning. Luk den åbne pakke igen med tørrepude.

Fortyndingsbuffer: fortynd fortyndingsbuffer (10 x) koncentrat 6100-02, 1/10 i destilleret vand.

Vaskeløsning: fortynd vaskeløsning (10 x) koncentrat 6100-03, 1/10 i destilleret vand. Du kan også vælge din egen vaskeløsning. Undgå buffere med indhold af fosfat, som kan hindre enzymatisk aktivitet af den alkaliske fosfatase.

Negative, svagt positive (afskårne) og positive **kontrolsera:** fortynd 10 μ l kontrolsera 6100-06 til -08 i 190 μ l fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/20).

Sera, som skal testes: fortynd 10 μ l serum i 2,0 ml fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/201).

Protein A - alkalisk fosfatase-**konjugat:** fortynd konjugat 6100-09 i fortyndingsbufferløsning (endelig fortynding 1/51).

Substratløsning: forvarm enzymbuffer 6100-04 ved omgivende temperatur. Før tilsætningen af substrat til Elisa brøndene, opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 6100-10 i ufortyndet buffer 6100-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst.

Stopløsning: anvend reagens 6100-05 ufortyndet.



Advarsler og sikkerhedshensyn: Løsninger 6100-02, 6100-03, 6100-04 og 6100-09 indeholder hhv. 0,1%, 0,05%, 0,01% og 0,1% natriumazid (N_3Na). Løsning 6100-02 indeholder 0,02% mertiolat. Disse stoffer er toksiske. Stopløsningen 6100-05 (0,5 M K_3PO_4) er lokalirriterende.

De negative, svagt positive og positive kontrolsera (6100-06 til -08) er fra kaniner.

Volumener, som skal klargøres:

			Det totale antal brønde, som skal anvendes:			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Fortyndingsbuffer (10 x)	6100-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Vaskeløsning (10 x)	6100-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	6100-09 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontrolsera	6100-06 til -08 + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera, som skal testes	Serum + fortyndingsbuffer	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratløsning	6100-10 + 6100-04	tabl. + ml	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5	1 + 2,5

Procedure:

Trin 1: Blokering:

Fyld brøndene helt op med fortyndingsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter ved omgivende temperatur.

Fjern fortyndingsbuffer gennem aspiration eller ved at ryste strimlerne over håndvasken.

Trin 2: Inkubation med serumprøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (no-serum blank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrolsera (100 µl hver).

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera, som skal testes (100 µl hver).

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern sera, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet protein A - alkalisk fosfatase-konjugat i hver brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Fjern konjugat, og vask 4 x med vaskeløsning.

Trin 4: Inkubation med substrat:

Fordel 100 µl substratløsning pr. brønd.

Dæk brøndene med selvklæbende tape, og inkuber i 30 minutter ved 37° C.

Stop reaktionen ved at tilsætte 100 µl stopløsning til hver brønd.

Trin 5: Måling af absorbanser:

Tør bunden af brøndene af, fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm.

Fortolkning:

Træk værdien af intet serum (no-serum blank) fra alle målte værdier. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt: absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200, A af negativ kontrol < 10% af A af positiv kontrol, A af blank mod luft < 0,350.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 6100-07 er indstillet for at skelne optimalt mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af aspergillose i immunkompetente patienter og sunde, humane sera.

Det afskårne indeks for en prøve defineres, efter subtraktion af no-serum blank, som:

$$\text{Indekset} = \frac{\text{Absorbans analyserede prøve}}{\text{Absorbans afskårne serum}}$$

Resultatet er **negativt**, når indekset af den analyserede prøve er lavere end **1.0**. I dette tilfælde er IgG antistofkoncentrationen mod **Aspergillus fumigatus** antigener klinisk ikke-signifikant.

Et gråt område modsvarer et indeks, som ligger mellem **0,8 og 1.0**. I dette tilfælde anses prøven som grænselinje; det anbefales at gentage testen med den samme prøve eller med et nyt serum af den samme patient efter 2-4 uger.

Resultatet er **positivt**, når indekset af den analyserede prøve er højere end **1.0**. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod **Aspergillus fumigatus** antigener for at være klinisk signifikant. Dette resultat leder til en aspergillose eller en aspergillose sensibilisering.

I hvert enkelt tilfælde skal resultaterne korreleres til radiokliniske observationer på patienten.

Ved patienter med nedsat immunforsvar anbefales det at gennemføre testen med springen af A. fumigatus antigener i serum.

Denne kvantitative og reproducerbare test giver mulighed for opfølgning af den serologiske vurdering af en given patient.

Analysens sensitivitet og specificitet:

En **sensitivitet** på **97%** blev fundet med 32 sera fra 19 patienter, som lider af forskellige arter af aspergillose (11 kronisk nekrotiserende aspergillose, 12 aspergillom, 2 aspergillus sinuit og 7 allergisk bronkopulmonal aspergillose). En sensitivitet på 22% blev fundet med 9 sera fra 5 patienter, som lider af invasiv aspergillose.

En **specificitet** på **98%** blev fundet med 131 sera fra 67 patienter, som lider af ikke-aspergillus luftvejssygdomme (candidosis, tuberkulose, pneumocystosis, cryptococcosis, viral eller bakteriel pneumoni).

Reperterbarhed blev bedømt ved at teste 2 humane serumprøver i 24 brønde i 1 analyse.

Reproducerbarhed blev vurderet ved at teste de 2 humane serumprøver i 10 forskellige analyser.

	Reperterbarhed		Reproducerbarhed	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gennemsnit (OD værdi)	0,352	1,767	0,410	1,985
Standardafvigelse (OD værdi)	0,027	0,069	0,038	0,096
Variationskoefficient (%)	7,6	3,9	9,3	4,8

Referencer:

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 aspergillose. 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

