

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Enzymkopplad immunadsorberande analys för diagnos aspergillosis av *A. fumigatus*

96 analyser på enskilda brunnar

Instruktioner för användning av artikel N° 6100

EC reg. N°: CH-201301-0006



Avsedd användning:

Serologisk diagnostik (IgG) av aspergillosis.

Uppföljning av patienter med risk för aspergillosis infektioner

Princip och presentation:

Kitet ger materialen som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på mikrotitrering brunnar sensibiliserade med den följande blandningen:

- Lösliga somatisk och metabolisk *Aspergillus fumigatus* antigener
- Rekombinanta antigener: dipeptidylpeptidase typ V (chymotrypsin) ribonuclease (mitogillin) från *Aspergillus fumigatus*

Närvaron av mykos specifikt serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Sensibiliserade brunnar är försedda som brytbara remsor för ekonomiska provningar av små serier av prover.

Material som ingår i kittet (96 provningar):

WELL	6100-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Aspergillus fumigatus</i> antigener	96	brunnar
DILB	6100-01	Utspädnings buffert (10 x) koncentrat	50	ml
WASH	6100-01	Tvätt lösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	6100-01	Enzym buffert	50	ml
STOP	6100-01	Stopplösning(K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-01	Negativt kontrollserum	200	µl
CONTROL -/+	6100-01	Svag positivt serum (avskuren)	200	µl
CONTROL +	6100-01	Positivt kontrollserum	200	µl
CONJ	6100-01	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat	300	µl
SUBS	6100-01	Fosfatas substrat	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram med ELISA 8 hållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kiten vid 2° till 8° C (transportera vid omgivningstemperatur). Utgångsdatumet och parti numret av kitet anges på sidan av lådan.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och μ l). Kolvar. Rör för utspädning av sera. Lim tejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37° C. ELISA läsare inställd på 405 Nm.

Preparationer av reagens innan användning:

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 6110-01 och ta bort antal brunnar som behövs. Placera sensibiliserade brunnar i 8-brunnars hållare. Om nödvändigt, slutför dem tomma positionerna i hållaren med använda brunnar. Sätt hållaren i ramen i rätt riktning. Återförsluta det öppna paketet med torkmedelsdyna.

Utspädningsbuffert: utspädd utspädningsbuffert (10 x) koncentrat 6110-02, 1/10 i destillerat vatten.

Tvätt lösning: utspädd tvätt lösning (10 x) koncentrat 6110-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvätt lösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas.

Negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv **kontroll sera:** utspädd 10 μ l kontroll sera 6110-06 till -08 i 190 μ l utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/20).

Sera som skall testas: utspädd 10 μ l serum i 2.0 ml utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/201).

Protein A - alkaliskt fosfatas **konjugat:** utspädd konjugat 6110-09 i utspädnings buffertlösning (slutlig utspädning 1/51).

Substratlösning: Förvärm enzymbuffert 6110-04 vid omgivningstemperatur. Före tillsats av substrat till ELISA-brunnar, upplös tabletter av fosfatas substrat 6110-10 i utspädd buffert. 6110-04 (1 tablett i 2.5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett.

Stopplösning: använd reagens 6110-05 utspädd.



Varningar och säkerhetsåtgärder: lösningar. 6100-02, 6100-03, 6100-04 och 6100-09 innehåller respektive 0.1%, 0.05%, 0.01% och 0.1% av sodium azide (N_3Na). Lösning 6100-02 innehåller 0.02% av merthiolate. Dessa ämnen är giftiga. Stopplösningen 6100-05 (0.5 M K_3PO_4) är irriterande.

Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontroll sera (6110-06 till -08) är från kaniner.

Volymer att förbereda:

			Totalt antal brunnar som skall användas			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Utspädningsbuffert (10x)	6100-02 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Tvätt lösning (10x)	6100-03 + H ₂ O	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Konjugat	6100-09 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Kontroll sera	6100-06 till -08 + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sera som skall testas	Serum + utspädningsbuffert	μ l + μ l	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Substratlösning	6100-10 + 6100-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

Procedur:

Steg 1: blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffert lösning.

Inkubera mellan 5 till 15 minuter vid omgivningstemperatur (blockering).

Ta bort utspädningsbuffert genom aspiration eller genom att skaka remsorna över diskbänken.

Steg 2: inkubation med serumprover:

Fyll i den första brunnen i remsan med bara 100 µl utspädningsbuffert (no-serum blank).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontroll sera respektive (100 µl var och en).

Fyll dem återstående brunnarna med utspädda sera som skall testas (100 µl var och en).

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort sera och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 3: inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med tvätt lösning.

Steg 4: inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

Täck brunnarna med lim tejp och inkubera i 30 minuter vid 37° C.

Stoppa reaktionen genom tillsats av 100 µl stopplösning i varje brunn.

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Torka botten av brunnarna, eliminera bubblor och mät absorbanserna vid 405 Nm.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serum blank från alla mätvärden. Testet är giltig om dem påföljande kriterierna uppfylls: absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200, A av negativ kontroll < 10 % av A av positiv kontroll, A av blank mot luft < 0,350.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 6100-07 has ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av aspergillosis I immunkompetenta patienter och friska humana sera.

Den avskurna index för ett prov definieras, efter subtraktion av icke-serum tomt, som:

$$\text{Index} = \frac{\text{absorbans prov}}{\text{absorbans avskuren serum}}$$

Resultatet är **negativ** när indexet av det analyserade provet är lägre än **1.0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Aspergillus fumigatus** antigen är kliniskt icke signifikant.

En gråzon motsvarar ett index som ligger mellan **0.8 och 1.0**. I detta fall, betraktas provet som gränslinje. Det är rekommenderat att upprepa testet med samma prov eller med ny serum av samma patient, tagen efter 2-4 veckor.

Resultatet är **positivt** när indexet av det analyserade provet är högre än **1.0**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Aspergillus fumigatus** intigen anses vara kliniskt signifikant. Detta resultat leder till en aspergillosis eller en aspergillosis sensibilisering.

I varje enskild fall, måste resultaten korreleras till radiokliniska observationer av patienten.

Vid patienter med nedsatt immunförsvaret, är det rekommenderat att genomföra testet med detektion av *A. fumigatus* antigener i serum.

Detta kvantitativa och reproducerbara prov tillåter uppföljning av serologiska utvärdering för en given patient.

Känsligheter och specificiteter hos analysen:

En känslighet av **97 %** hittades med 32 sera från 19 patienter lidande av olika aspergillosis (11 kronisk nekrotiserande aspergillosis, 12 aspergilloma, 2 aspergillus sinusitis och 7 allergisk bronchopulmonary aspergillosis).

En känslighet av **22 %** hittades med 9 sera från 5 patienter lidande från invasiv aspergillosis.

En specificitet av **98 %** hittades med 131 sera från 67 patienter lidande från icke aspergillus luftvägssjukdomar (candidosis, tuberculosis, pneumocystosis, cryptococcosis, viral eller bacterial pneumonia.)

Repetierbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 24 brunnar på en analys.

Reproducerbarhet bedömdes genom att testa 2 humana serumprover i 10 olika analyser.

	Repetierbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (OD värde)	0.352	1.767	0.410	1.985
Standardavvikelse (OD värde)	0.027	0.069	0.038	0.096
Variationskoefficient (%)	7.6	3.9	9.3	4.8

Referenser:

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

