

# ASPERGILLUS FUMIGATUS

## Prueba inmunoenzimática para el diagnóstico de la aspergilosis

96 pruebas inmunoenzimáticas destinadas para el uso in vitro

Instructivo de uso para el artículo N° 6100  
N° CE: CH-201301-0006



### Utilización destinada del producto:

Diagnóstico serológico (IgG) de la aspergilosis. Seguimiento de los pacientes con riesgo de infección por aspergilosis.

### Principio de la prueba y presentación:

El kit contiene el material necesario para efectuar 96 pruebas inmunoenzimáticas (Prueba ELISA). Se realiza en pocillos sensibilizados con una mezcla de antígenos de *Aspergillus fumigatus*:

- Antígenos soluble somático y metabólico de *Aspergillus fumigatus*
- Antígenos recombinantes: dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsin) y ribonuclease (mitogillin) de *Aspergillus fumigatus*

La presencia de anticuerpos séricos específicos contra el antígeno parasitario es detectada mediante un conjugado proteína A - fosfatasa alcalina. Los pocillos individuales sensibilizados, permiten de realizar pequeñas series de muestras.

### Material que contiene el kit (96 pruebas):

<b>WELL</b>	6100-01	Pocillos sensibilizados con una mezcla de antígenos de <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	pocillos
<b>DILB</b>	6100-02	Tampón de dilución (concentrado 10 x)	50	ml
<b>WASH</b>	6100-03	Solución de lavado (concentrado 10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	6100-04	Tampón de la enzima	50	ml
<b>STOP</b>	6100-05	Solución de parada (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL</b> -	6100-06	Suero de control negativo	200	µl
<b>CONTROL</b> -/+	6100-07	Suero de control débilmente positivo (Cut off)	200	µl
<b>CONTROL</b> +	6100-08	Suero de control positivo	200	µl
<b>CONJ</b>	6100-09	Conjugado proteína A – fosfatasa alcalina	300	µl
<b>SUBS</b>	6100-10	Substrato de la fosfatasa	20	tabletas
		Reservorio de reactivos para pipeta multicanal 25ml	1	pieza
		Cuadro para el soporte de los pocillos	1	cuadro

### Conservación:

Conservar el kit entre 2° y 8° C (el transporte a temperatura ambiente). La fecha de caducidad y el número de lote de producción son escritos en un costado de la caja.

## Material necesario no incluido en el kit:

Pipetas ( $\mu\text{l}$  y ml). Recipientes. Tubos para la dilución des sueros. Lámina adhesiva para cubrir los pocillos durante la incubación. Agua destilada. Incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$ . Lector ELISA ajustado a una longitud de onda de  $405\text{nm}$ .

## Preparación de reactivos antes de la utilización:

**Pocillos sensibilizados:** Abrir el embalaje en aluminio 6100-01 y tomar la cantidad necesaria de pocillos. Poner los pocillos en el soporte. Si es necesario completar las posiciones no utilizadas con pocillos ya utilizados. Disponer el soporte en el cuadro respetando la orientación. Mantenga los pocillos no utilizados sellados en la bolsa con el desecante.

**Tampón de dilución:** diluir el tampón de dilución concentrado 10 x 6100-02, 1/10 en agua destilada.

**Solución de lavado:** diluir la solución de lavado concentrado 10 x 6100-03, 1/10 en agua destilada. Si usted desea utilizar su propia solución de lavado, evite tampones que contienen fosfato, lo cual podría inhibir la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina.

**Sueros de control** negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo: diluir 10  $\mu\text{l}$  de cada suero de control 6100-06 a -08 en 190  $\mu\text{l}$  de tampón de dilución (dilución final: 1/20).

**Sueros de pacientes:** diluir 10  $\mu\text{l}$  de suero en 2.0 ml de tampón de dilución (dilución final: 1/201).

**Conjugado proteína A-fosfatasa alcalina:** diluir el conjugado 6100-09, 1/51 utilizando el tampón de dilución.

**Solución de sustrato:** equilibrar el tampón de la enzima 6100-04 a temperatura ambiente. Antes de la adición del sustrato de la fosfatasa en los pocillos ELISA, disolver la cantidad necesaria de tabletas de sustrato 6100-10 en el tampón de la enzima 6100-04 no diluida (una tableta en 2.5 ml de tampón). Mezclar bien hasta que la tableta se haya disuelto.

**Solución de parada:** utilizar el reactivo 6100-05 no diluido.



**Precauciones de uso:** Las soluciones 6100-02, 6100-03, 6100-04 y 6100-09 contienen respectivamente 0.1%, 0.1%, 0.01% et 0.1% de ácido de sodio ( $\text{Na}_3\text{N}_3$ ). La solución 6100-02 contiene 0.02% de merthiolate. Estas sustancias son tóxicas. La solución de parada 6100-05 ( $0.5\text{ M K}_3\text{PO}_4$ ) es irritante

Los sueros de control negativo, débilmente positivo y positivo (6100-06 a -08) son sueros de conejo.

## Volúmenes a preparar:

			Cantidad de pocillos a utilizar			
			3-4	5-6	7-8	9-10
Tampón de dilución (10 x)	6100-02 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Sol. de lavado (10 x)	6100-03 + $\text{H}_2\text{O}$	ml + ml	1 + 9	2 + 18	3 + 27	4 + 36
Conjugado	6100-09 + tampón de dilución	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 500	15 + 750	20 + 1000	25 + 1250
Sueros de controles	6100-06 à -08 + tampón de dilución	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 190	10 + 190	10 + 190	10 + 190
Sueros a analizar	suero + tampón de dilución	$\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000	10 + 2000
Sol. de sustrato	6100-10 + 6100-04	tabl. + ml	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5	1 + 2.5

## **Procedimiento:**

### **Etapa 1: Bloqueo:**

Llenar completamente los pocillos con la solución de tampón de dilución.

Incubar 5 a 15 minutos a temperatura ambiente (bloqueo de los pocillos).

Eliminar el tampón de dilución por aspiración o sacudiendo el soporte con los pocillos en el lavabo.

### **Etapa 2: Incubación con las muestras de suero a analizar:**

Llenar el primer pocillo de la tira con 100 µl de tampón de dilución (Blanco sin suero)

Llenar los 3 pocillos siguientes con 100 µl de sueros de controles diluidos (suero negativo, débilmente positivo (cut off) y positivo).

Llenar los otros pocillos con los sueros a analizar diluidos (100 µl).

Cubrir los pocillos con un film adhesivo e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar los sueros y lavar 4 veces con la solución de lavado.

### **Etapa 3: Incubación con el conjugado:**

Distribuir 100 µl de conjugado proteína A-fosfatasa diluido en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Eliminar el conjugado y lavar 4 veces con la solución de lavado.

### **Etapa 4: Incubación con el sustrato:**

Distribuir 100 µl de la solución del sustrato en cada pocillo.

Cubrir los pocillos con una lámina adhesiva e incubar 30 minutos a 37°C.

Parar la reacción en adicionando 100 µl de la solución de parada a cada pocillo.

### **Etapa 5: Medida de la densidad óptica:**

Limpiar la parte inferior externa de los pocillos con un papel absorbente, eliminar las burbujas de aire en caso de necesidad y proceder a la lectura de la densidad óptica (DO absorbencia) a una longitud de onda de 405 nm.

## Interpretación:

Sustraer el valor obtenido del pocillo blanco sin suero de todos los otros valores medidos. La prueba es válida si los tres criterios siguientes se cumplen: DO del control positivo >1.200, DO del control negativo <10% del control positivo, DO del blanco < 0.350.

La concentración en anticuerpos del suero cut off (6100-07), ha sido ajustada para poder distinguir de una manera óptima los sueros de casos clínicos de aspergilosis de pacientes inmunocompetentes y los sueros de sujetos sanos.

El índice cut off de cada muestra se define, realizando una sustracción del pocillo blanco en ausencia de suero, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice} = \frac{\text{DO suero paciente}}{\text{DO suero cutoff}}$$

El resultado es **negativo** cuando el suero índice del paciente es de menor de **0,8**. En este caso, la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra el antígeno de ***Aspergillus fumigatus*** no es clínicamente significativo.

El **área gris** corresponde a un índice entre **0,8 y 1,0**. En este caso, la muestra debe ser considerada como límite (dudosa), se recomienda entonces repetir la prueba con el mismo suero o con un nuevo suero del mismo paciente tomado 2 a 4 semanas más tarde.

El resultado es **positivo** cuando el índice de suero es superior a **1,0**. En este caso, la concentración de anticuerpos IgG dirigidos contra el antígeno de ***Aspergillus fumigatus*** se considera clínicamente significativa. Este resultado orienta hacia una sensibilización al aspergillus o una aspergilosis.

En todos los casos, los resultados deben ser correlacionados con las observaciones radiológicas y clínicas para cada paciente.

En el caso de pacientes inmunodeprimidos, se recomienda completar la prueba con una detección de antígeno de ***Aspergillus fumigatus*** en el suero.

Esta prueba cuantitativa y reproducible permite de realizar un seguimiento serológico del paciente.

## Sensibilidad y especificidad de la prueba:

Se observó una **sensibilidad** de **97%** con 32 sueros de 19 pacientes afectados por diversos tipos de aspergilosis (11 aspergilosis crónica necrotizante, 12 aspergilomas, 2 sinusitis por aspergillus y 7 aspergilosis broncopulmonar alérgica).

Se obtuvo una sensibilidad del 22% con 9 sueros de 5 pacientes con aspergilosis invasiva.

Se obtuvo una **especificidad** del 98% con 131 sueros de 67 pacientes afectados por otras patologías respiratorias que no son debidas al aspergillus (candidiasis, tuberculosis, neumonía por *Pneumocystis*, criptococosis y neumonías virales o bacterianas).

La repetitividad ha sido evaluada analizando 2 sueros humanos en 24 pocillos de una placa en una prueba única. La reproducibilidad ha sido evaluada analizando estas 2 muestras precitadas en 10 pruebas diferentes.

	Repetitividad		Reproducibilidad	
	Muestras 1	Muestras 2	Muestras 1	Muestras 2
<b>Media (densidad óptica)</b>	0.352	1.767	0.410	1.985
<b>Desviación estándar (absorbance)</b>	0.027	0.069	0.038	0.096
<b>Coefficiente de variación (%)</b>	7.6	3.9	9.3	4.8

## Bibliografía:

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 aspergilosis. 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

