

# ASPERGILLUS FUMIGATUS

## Immuno-enzymatische test voor de diagnose Aspergillose bij mensen

96 testen op afscheurbare stripjes bedoeld voor in vitro gebruik

Instructies voor het gebruik van het artikel N° 6100  
N° CE: CH-201301-0006



### Wordt gebruikt voor:

Serologische diagnose (IgG) van Aspergillose.  
Follow up van patiënten met een risico van een Aspergillose.

### Principe en presentatie:

De kit bevat het materiaal wat nodig is voor 96 gekoppelde immuno-enzymatische testen (ELISA test) op deelbare stripjes die gesensibiliseerd zijn met:

- Oplosbare somatische en metabolische *Aspergillus fumigatus* antigenen
- Recombinant antigenen: dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsin) en ribonuclease (mitogillin) van *Aspergillus fumigatus*

De aanwezigheid van specifieke anti-lichamen tegenover het mycose antigen wordt gedetecteerd met een Proteïne A - Alkaline fosfatase conjugaat. De gesensibiliseerde strips met de individuele test cupjes maken het mogelijk op een economische wijze kleine hoeveelheden monsters te testen.

### Materiaal aanwezig in de kit (96 tests):

|                    |         |   |     |           |
|--------------------|---------|---|-----|-----------|
| <b>WELL</b>        | 6100-01 | Deelbare ELISA strips gesensibiliseerd met <i>Aspergillus fumigatus</i> antigenen | 96  | putjes    |
| <b>DILB</b>        | 6100-02 | Verdunningsvloeistof (10X geconcentreerd)   | 50  | ml        |
| <b>WASH</b>        | 6100-03 | Wasvloeistof (10X geconcentreerd)   | 50  | ml        |
| <b>ENZB</b>        | 6100-04 | Enzyme buffer   | 50  | ml        |
| <b>STOP</b>        | 6100-05 | Stop oplossing (K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )                                  | 25  | ml        |
| <b>CONTROL -</b>   | 6100-06 | Negatief controle serum   | 200 | µl        |
| <b>CONTROL -/+</b> | 6100-07 | Zwak positief controle serum (drempel)  | 200 | µl        |
| <b>CONTROL +</b>   | 6100-08 | Positief controle serum   | 200 | µl        |
| <b>CONJ</b>        | 6100-09 | Proteïne-A Alkaline fosfatase conjugaat   | 300 | µl        |
| <b>SUBS</b>        | 6100-10 | Fosfatase substraat   | 20  | tabletten |
|                    |         | Reservoir voor de reactieven voor 25 ml multi pipetten                            | 1   | stuk      |
|                    |         | Kader voor ELISA 8 cupjes houder  | 1   | kader     |

### Bewaar condities:

Bewaar de kit tussen 2 en 8° C (transport op kamer temperatuur). De vervaldatum en het productie nummer staat gedrukt op de doos.

## Nodig materiaal niet geleverd met de kit:

Pipetten ( $\mu\text{l}$  en ml), bakjes, tubes voor de verdunning van de sera. Plakband om de cupjes te bedekken gedurende de incubaties. Gedestilleerd water. Incubator afgesteld op  $37^{\circ}\text{C}$ . ELISA lezer afgesteld op 405 nm.

## Vorbereiding van de reactieven:

**Gesensibiliseerde strips:** Open de zijkant van het aluminium zakje en neem de nodige strips er uit. Plaats de gesensibiliseerde strips in de 8 cupjes houder. Zo nodig markeer de posities van de ongebruikte cupjes met de gebruikte cupjes. Plaats de houder in de lijst in de goede richting. Conserveer de niet gebruikte strips in de goed gesloten verpakking met het silicagel kussentje.

**Verdunningsvloeistof:** Verdun de geconcentreerde (10x) verdunningsvloeistof 6100-02, 1:10 in gedestilleerd water.

**Wasoplossing:** Verdun de geconcentreerde (10x) wasoplossing 6100-03, 1:10 in gedestilleerd water. Zo gewent kunt U ook uw eigen wasoplossing gebruiken. Buffers die fosfaten bevatten moeten vermeden worden om de enzymatische activiteit van de fosfatase niet te verhinderen.

**Negatief controle serum, zwak positief (drempel) en positief serum:** Verdun 10 microliters controle serum 6100-06 tot 08 in 190 microliters verdunning vloeistof (eind verdunning 1/20).

**De te testen sera:** Verdun 10 microliters serum in 2.0 ml verdunning vloeistof (1/20).

**Protein A-alkaline fosfatase conjugaat:** Verdun het conjugaat 6100-09 in TBS-tween 1:51.

**Substraat oplossing:** Breng de onverdunde enzyme buffer 6100-04 op kamertemperatuur. Voeg het substraat toe in de ELISA cupjes, los de fosfaat-substraat tabletjes (6100-10) op. Eén tabletje in 2.5ml buffer (6100-04). Goed mengen tot dat de tabletjes goed opgelost zijn.

**Stopoplossing:** Gebruik reagent 6100-05 onverdund.



**Waarschuwing:** Soluties 6100-02, 6100-03, 6100-04 en 6100-09 bevat respectievelijk 0.1%, 0.01%, 0.05%, 0.01% et 0.1% sodium azide ( $\text{N}_3\text{N}_3$ ). Oplossing 6100-02 bevat 0.02% merthiolaat. De stopoplossing 6100-05 (0.5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) is irriterend.

De negatieve, zwak positieve en positieve sera (6100-06 tot 08) zijn afkomstig van konijnen.

## Maak de volgende oplossingen:

|                                    |  |                               | Totaal aantal te gebruiken cupjes |           |           |           |
|------------------------------------|--|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                    |  |                               | 3-4                               | 5-6       | 7-8       | 9-10      |
| <b>Verdunning vloeistof (10 x)</b> | 6100-02 + $\text{H}_2\text{O}$         | ml + ml                       | 1 + 9                             | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Wasoplossing (10 x)</b>         | 6100-03 + $\text{H}_2\text{O}$         | ml + ml                       | 1 + 9                             | 2 + 18    | 3 + 27    | 4 + 36    |
| <b>Conjugaat</b>                   | 6100-09 +verdunningsvloeistof          | $\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$ | 10 + 500                          | 15 + 750  | 20 + 1000 | 25 + 1250 |
| <b>Controle sera</b>               | 6100-06 tot -08 + verdunningsvloeistof | $\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$ | 10 + 190                          | 10 + 190  | 10 + 190  | 10 + 190  |
| <b>Te testen sera</b>              | Serum + verdunningsvloeistof           | $\mu\text{l}$ + $\mu\text{l}$ | 10 + 2000                         | 10 + 2000 | 10 + 2000 | 10 + 2000 |
| <b>Substraat</b>                   | 6100-10 + 6100-04                      | tabl. + ml                    | 1 + 2.5                           | 1 + 2.5   | 1 + 2.5   | 1 + 2.5   |

## **Methode:**

### **Stap 1: Blokkage:**

Vul de cupjes met verdunning vloeistof.

Incubeer 5 tot 15 minuten op kamer temperatuur (Blokkage).

Verwijder de verdunningsvloeistof door afzuigen of uitkloppen van de strips in de gootsteen.

### **Stap 2: Incubatie met serum van de monsters:**

Vul het eerste cupje van de eerste strip met 100 microliters verdunningsvloeistof (geen serum, blanco).

Vul de volgende 3 cupjes met 100 microliter verdund negatief, zwak positief (drempel) en positief serum.

Vul de andere cupjes met de te testen verdunde sera ( 100 microliter).

Bedek de cupjes met plakband en incubeer 30 minuten op 37°C.

Verwijder de sera en was 4x met wasoplossing.

### **Stap 3: Incubatie met conjugaat:**

Verdeel 100 microliter Protein A-Alkaline fosfatase conjugaat in elk cupje.

Bedek met plakband en incubeer 30 minuten op 37°C.

Verwijder het conjugaat en was 4x met de wasoplossing.

### **Stap 4: Incubatie met substraat:**

Verdeel 100 microliter substraatoplossing per cupje.

Bedek de cupjes met plakband en incubeer gedurende 30 minuten op 37°C.

Stop de reactie door toevoeging van 100 microliter stopoplossing in elk cupje.

### **Stap 5: Meting van de absorptie:**

Droog de onderkant van de strips, verwijder luchtbelletjes en meet de absorptie op 405 nm.

## Interpretatie van de resultaten:

De gemeten waarden van de blanco (alleen verdunningsvloeistof, geen serum) wordt van alle andere gemeten waarden afgetrokken. De test wordt betrouwbaar geacht als die aan de volgende criteria voldoet: Absorptie (A) van de positieve controle > 1.200, A van de negatieve controle < 10% van A van de positieve controle en A van de blanco tegen over lucht < 0.350.

De concentratie van de antilichamen van een zwak positief serum 6100-07 werd zo bepaald voor een optimaal onderscheid te kunnen maken tussen klinische gevallen van *Aspergillose* bij immuun-competente patiënten en sera van gezonde personen.

De cut-off index wordt bepaald, na de aftrek van de blanco met volgende formule

$$\text{Index} = \frac{\text{OD staal}}{\text{OD cut off}}$$

Het resultaat is negatief wanneer de index van het te testen serum lager is dan **1**. In dit geval is de IgG antilichamen concentratie tegen *Aspergillus fumigatus* antigenen klinisch niet significant.

De grijze zone correspondeert met en index tussen **0,8** en **1.0**. In dit geval moet het staal beschouwd worden als borderline. Het wordt aanbevolen de test te herhalen op hetzelfde serum of met een nieuw serum van dezelfde patiënt, 2 tot 4 weken later genomen.

Het resultaat is positief wanneer de index van het te testen serum hoger is dan **1.0**. In dat geval is concentratie van IgG antilichamen tegen *Aspergillus fumigatus* antigenen klinisch niet significant. Dit resultaat duidt op een aspergillaire sensibilisatie of een *Aspergillose*. In alle gevallen moeten de resultaten geïnterpreteerd worden in combinatie met de radio-klinische observaties voor de patiënt.

Bij immuun-supressed patiënten is het aanbevolen de test te complementeren met de detectie van *Aspergillus fumigatus* antigenen in het serum.

Deze kwantitatieve en reproduceerbare test maakt het mogelijk de serologische evolutie van een zelfde patiënt te volgen.

## Sensibiliteit en specificiteit van de test:

Een gevoeligheid van 97% werd geobserveerd bij 32 sera van 19 patiënten met verschillende aspergillosen (11 chronische, necrotiserende aspergillose, 12 aspergilloma, 2 aspergillaire sinusitis en 7 allergische broncho-pulmonaire aspergillosen).

Een gevoeligheid van 22% werd geobserveerd bij 9 sera van 5 patiënten met invasieve aspergillose.

Een specificiteit van 98% werd geobserveerd bij 131 sera van 67 patiënten met niet aspergillaire ademhalingspathologieën (candidosis, tuberculose, pneumocystose, cryptococcose, virale of bacteriële pneumonie).

De herhaalbaarheid werd geëvalueerd door het testen van 2 menselijke sera in 24 cupjes in één enkel experiment. De reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door het testen van 2 monsters bij 10 verschillende experimenten.

|  | Herhaalbaarheid |           | Reproduceerbaarheid |           |
|--|-----------------|-----------|---------------------|-----------|
|  | Monster 1       | Monster 2 | Monster 1           | Monster 2 |
| <b>Gemiddeld (absorptie, A)</b>          | 0.352           | 1.767     | 0.410               | 1.985     |
| <b>Standaardafwijking (absorptie, A)</b> | 0.027           | 0.069     | 0.038               | 0.096     |
| <b>Variatie Coëfficiënt (%)</b>          | 7.6             | 3.9       | 9.3                 | 4.8       |

## Referenties:

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**

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

