

Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Enzymkoblet immunadsorberende analyse til diagnose af human aspergillose by *Aspergillus fumigatus*

96 analyser på særskilte brønde til in vitro diagnostisk brug og til professionel laboratoriebrug



Instruktioner for anvendelse af artikel N° 6100
N.º reg. CE: CH-201301-0006 - UDI-DI: 07640158216101



Tilsigtet anvendelse:

Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA kit er beregnet til kvantitativ påvisning af IgG antistoffer mod *Aspergillus fumigatus* i humant serum. Serologi er en hjælp til diagnose og kan ikke bruges som eneste diagnosemetode. Denne test er også beregnet til opfølgning af patienter med risiko for aspergilloseinfektioner.

Baggrund:

Pulmonal aspergillose er forårsaget af forskellige patogene arter af svampegruppen *Aspergillus*, den hyppigst implicerede som *Aspergillus fumigatus*. Dette patogen findes i jord og i nedbrydning af organisk materiale. Mennesker inhalerer hundreder af sporer om dagen, men kun personer med risikofaktorer udvikler forskellige typer aspergillose: allergisk bronchopulmonal aspergillose, allergisk bihulebetændelse, aspergillom og kronisk lungespergillose. De vigtigste symptomer er hoste og åndenød. Da disse symptomer er uspecifikke, er diagnosen baseret på en kombination af kliniske, radiologiske, biologiske og mykologiske kriterier. Serologi er et vigtigt kriterium, og der findes flere metoder til screening, opfølgning og bekræftelse.

Princip og præsentation

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

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

Specifikke antistoffer i prøven vil binde til disse antigener, og vask vil fjerne uspecifikke antistoffer. Forekomsten af mykosespecifikke serum antistoffer påvises med en Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. En ekstra vask vil fjerne ubundet konjugat. Afsløring af bundne antistoffer vil ske ved tilsætning af pNPP substrat, som bliver gul i nærvær af alkalisk phosphatase. Farveintensitet er proportional med mængden af *Aspergillus fumigatus*-specifikke antistoffer i prøven. Kaliumphosphat tilsættes for at stoppe reaktionen. Absorbans ved 405 nm læses ved anvendelse af en ELISA mikroplade læser.

Prøven kan udføres med automatiske systemer, men dette skal valideres af brugeren.

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 farvet lilla	50	ml	
WASH	6100-03	Vaskeløsning (10 x) koncentrat	50	ml	
ENZB	6100-04	Enzym buffer	50	ml	
STOP	6100-05	Stopløsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml	
CONTROL	-	6100-06	Negativt kontrolserum (20 x), grøn hætte	200	µl
CONTROL	-/+	6100-07	Svagt positivt kontrolserum (afskåret, 20 x), gul hætte	200	µl
CONTROL	+	6100-08	Positivt kontrolserum (20 x), rød hætte	200	µl
CONJ	6100-09	Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hætte	300	µl	
SUBS	6100-10	Fosfatase-substrat (Para-nitrophenylphosphat)	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), undgå langsigtet eksponering af komponenterne i direkte lys. Kittets udløbsdato og partinummer er trykt på siden af kassen. Efter første åbning er alle reagenser stabile indtil udløbsdatoen, dette er om de opbevares ved 2-8°C.

Nødvendigt udstyr, som ikke følger med kittet:

Pipetter (ml and µl). 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. Manuel eller automatisk udstyr til skyling af brønde. Vortex mixer. Timer.

Klargøring af reagens inden anvendelse:

Hold alle reagenser i stuetemperatur og bland dem inden brug.

Elisa brønde: åbn siden af aluminiumstasken 6100-01, og tag det nødvendige antal brønde. (en for blankt, tre for kontroller plus antal prøver). 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. Dette anvendes til fortynding af kontroller, prøver og konjugater. Den fortyndede buffer er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

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. Den fortyndede vaskeopløsning er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

Kontrolsera: fortynd 10 µl kontrolsera 6100-06 til -08 i 190 µl fortyndingsbufferopløsning (endelig fortynding 1/20). Den fortyndede kontrolsera er stabil i 2 måneder ved 2-8°C.

Konjugat: fortyndet konjugat 6100-09 i fortyndingsbufferopløsning (slutfortynding 1/50). Fortynd konjugat på analysedagen. Opbevar ikke fortyndet konjugat.

Substratløsning: opløs tablet(ter) af fosfatase-substrat 6100-10 i ufortyndet enzym buffer 6100-04 (1 tablet i 2,5 ml buffer). Ryst, indtil tabletterne er fuldstændigt opløst. Fortynd substratet på analysedagen og beskyt røret fra direkte lys. Tabletter og substratopløsninger bør være farveløse eller bør kun have en lille gul tinge. Hvis en tablet eller en substratopløsning bliver gul, kan den have været delvis hydrolyseret og bør kasseres. Opbevar ikke substratopløsningen.

Stopløsning: anvend reagens 6100-05 ufortyndet.

Prøveudtagning og forberedelse:

Brug humant serum. Hvis analyseres inden for få dage skal serum skal opbevares ved 2-8°C, ellers opbevares ved -20°C eller lavere. Undgå at gentage frysning og optøning. Vortex prøver og fortynd 1/201 i fortyndingsbufferopløsning (fx 5 µl prøve i 1,0 ml).

Advarsler og sikkerhedshensyn:

Giftige stoffer findes i følgende koncentration:

Komponent	Reference	Natriumazid (NaN ₃)	Merthiolat
Fortyndingsbuffer (10 x)	6100-02	0,1%	0,02%
Vaskeopløsning (10 x)	6100-03	0,05%	/
Enzymbuffer	6100-04	0,01%	/
Kontrolsera (20 x)	6100-06 til -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	6100-09	0,1%	/

Ved de anvendte koncentrationer har natriumazid og merthiolat ingen toksikologisk risiko ved kontakt med hud og slimhinder.

- Stopløsning 6100-05 (0,5 M K₃PO₄) er lokalirriterende.
- Den negative, svage positive og positive kontrolsera (6100-06 til -08) er fra kaniner.
- Behandle alle reagenser og prøver som potentielt infektiøst materiale.
- Byt ikke reagenser fra forskellige partier eller Bordier ELISA kits.
- Brug ikke reagenser fra andre producenter med reagenser i dette kit.
- Brug ikke reagenser efter deres udløbsdatoe.
- Luk reagensflasker tæt straks efter brug, og udskift ikke skruehætter for at undgå forurening.
- Brug separate og rene pipetter tips til hver prøve.
- Mikrobrønde må ikke genbruges.
- Undgå forringelse af mikrobrønde ved mekanisk påvirkning (spidser/kegler, dyser).
- Beskrivelser af de anvendte symboler på etiketterne kan findes på hjemmesiden www.bordier.ch.

Vedrørende Bortskaffelse:

Alle materialer, der bliver anvendt i denne test, betragtes generelt som farligt affald. Henvis til nationale og regionale love og bestemmelser for bortskaffelse af farligt affald.

Procedure:

Når du kører analysen, undgå at der dannes bobler i brøndene.

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 prøver:

Fyld den første strimmels første brønd med 100 µl fortyndingsbuffer (ikke-serumblank).

Fyld de efterfølgende tre brønde med henholdsvis 100 µl fortyndede negative, svagt positive (afskårne) og positive kontrol serum. Til analyser med mere end 25 prøver anbefaler vi at fylde de tre sidste brønde med kontrol sera som et duplikat.

Fyld de resterende brønde med fortyndede sera prøver (100 µl hver).

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

Fjern sera, og vask 4 x ~ 250 µl med vaskeløsning.

Trin 3: Inkubation med konjugat:

Fordel 100 µl fortyndet konjugat i hver brønd. (inklusive ikke-serumblank).

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

Fjern konjugat, og vask 4 x med ~ 250 µl 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:

Hvis det er nødvendigt, tør bunden af brøndene af, og fjern bobler, og mål absorbanser ved 405 nm. inden for 1 time efter tilsætning af stopopløsning.

Fortolkning:

Træk værdien af ikke-serumblank fra alle målte værdier. Når det er relevant, beregnes de gennemsnitlige absorbansværdier for duplikeret serumkontrol. Testen er valid, hvis de følgende kriterier er opfyldt:

- Absorbans (A) af positiv kontrol > 1,200
- A med svag positiv kontrol > 11% af A med positiv kontrol
- A af negativ kontrol < 8% af A af positiv kontrol
- A af ikke-serumblank < 0,350

Kvalitetskontrol af aktuelle partier offentliggøres på vores hjemmeside: www.bordier.ch.

Antistofkoncentrationen af det svagt positive (afskårne) serum 6100-07 er indstillet for optimalt at skelne mellem sera fra klinisk dokumenterede tilfælde af aspergillose i immunkompetente patienter og sunde, humane sera. Afsnitets afskårne indeks defineres efter subtraktion af det ikke-serumblank som:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{absorbans prøve}}{\text{Absorbans afskåret serum}}$$

Resultatet er **negativt**, når Indeks af den analyserede prøve er lavere end **0,8**. 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 Indeks af den analyserede prøve er højere end **0,8**. I dette tilfælde anses IgG antistofkoncentrationen mod *Aspergillus fumigatus* antigener at være klinisk signifikant. Dette resultat leder til en aspergillose eller en aspergillose sensibilisering.

I tilfælde af et positivt eller tvivlsomt resultat, anbefaler vi at udføre en bekræftelsestest (oftest med western blotting), hvis en sådan test er tilgængelig eller kræves i henhold til nationale bestemmelser.

Analytisk ydeevne:

Analytisk specificitet:

Der blev fundet en følsomhed på 22 % med 9 sera fra 5 patienter, der led af invasiv aspergillose. I tilfælde af immunsupprimerede patienter anbefales det at fuldføre testen med påvisning af *A. fumigatus*-antigener i serum. Der blev fundet en specificitet på 97 % med 36 sera fra 24 patienter, der led af ikke-*Aspergillus* respiratoriske sygdomme (candidiasis, tuberkulose, pneumocystose og kryptokokose).

Der blev ikke observeret nogen positiv eller negativ interferens med suprafysiologiske koncentrationer af hæmoglobin, lipider eller bilirubin i sera suppleret med interferenter.

Præcision:

Repeaterbarhed 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.

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

Følgende præstationer kan ikke evalueres, fordi der ikke er noget certificeret referencemateriale til denne analyse:

- Analytisk følsomhed (detektions- og kvantificeringsgrænser)
- Nøjagtighed
- Rigtighed
- Måleområde
- Linearitet

Kliniske præstationer:

Diagnostisk følsomhed:

Der blev fundet en specificitet på 97 % med 230 sera fra 147 patienter, der led af forskellige former for aspergillose (104 kronisk pulmonal aspergillose (herunder 17 aspergillomer) og 43 allergiske bronkopulmonal aspergillose).

Diagnostisk specificitet:

Der blev fundet en specificitet på 90 % med 206 sera fra 205 patienter med respiratoriske symptomer, hvor en *Aspergillus*-relateret sygdom var blevet udelukket.

Positiv og negativ prædiktiv værdi:

Der blev fundet en PPV på 92% og en NPV på 96% hos de ovenfor nævnte populationer.

Forventede værdier i normale og berørte populationer:

I en normal population på 99 schweiziske bloddonorer, 98 sera fra en schweizisk infektologisk enhed og 90 sera fra patienter med mistænkt aspergillose, men hvor denne sygdom helt sikkert er blevet udelukket, er den forventede indekxsværdi 0,16. I en påvirket population på 63 sera fra patienter, der lider af forskellige former for aspergillose, er den forventede indekxsværdi 2,16.

Hændelser:

Enhver alvorlig hændelse, der indtræffer i forbindelse med udstyret, skal meddeles fabrikanten og den kompetente myndighed i den medlemsstat, hvor brugeren og/eller patienten er etableret.

Begrænsninger:

Diagnose af en smitsom sygdom bør ikke udarbejdes på basis af et enkelt testresultat. En præcis diagnose bør tage hensyn til endemisk situation, klinisk historie, symptomatologi, billeddannelse samt serologiske data.

Hos immunkompromitterede patienter og nyfødte er serologiske data af begrænset værdi.

Referencer:

Barrera, C., Richaud-Thiriez, B., Rocchi, S., Rognon, B., Roussel, S., Grenouillet, F., Laboissière, A., Dalphin, J.C., Reboux, G. and Millon, L. (2016) New commercially available IgG kits and time-resolved fluorometric IgE assay for diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Clin Vaccine Immunol* **23**, 196–203.

Dumollard, C., Bailly, S., Perriot, S., Brenier-Pinchart, M.P., Saint-Raymond, C., Camara, B., Gangneux, J.P., Persat, F., Valot, S., Grenouillet, F., Pelloux, H., Pinel, C., Cornet, M. and Grenoble *Aspergillus* Committee. (2016) Prospective evaluation of a new *Aspergillus* IgG enzyme immunoassay kit for diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol* **54**, 1236–1242.

Wilopo, B., A., P., Hunter, E., S., Richardson, M., D. and Denning, D., W. (2020) Optimising the cut-off of the Bordier *Aspergillus* IgG ELISA for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *J. Microbiol. Methods* **176**.

