

Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Enzymkopplad immunabsorberande analys för diagnos av mänskliga aspergillos av *A. fumigatus*

96 analyser på enskilda brunnar för in vitro diagnostisk användning och för professionell laboratorieanvändning



Instruktioner för användning av artikel N° 6100
N° reg. CE: CH-201301-0006 - UDI-DI: 07640158216101



Avsedd användning:

Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA kitet är avsedd för kvantitativ upptäckt av IgG antikroppar mot *Aspergillus fumigatus* i mänskligt serum. Sereologi är ett hjälpmedel mot diagnoser och kan användas som ensam metod för diagnos. Detta test är också avsett för uppföljning av patienter med risk för aspergillos-infektioner.

Bakgrund:

Lungaspergillos orsakas av olika patogena arter av svampgenren *Aspergillus*, där den vanligast implicerade är *Aspergillus fumigatus*. Denna patogen finns i jord och i sönderfallande organisk material. Människor inhalerar hundratals sporer per dag, men endast personer med riskfaktorer kommer att utveckla olika typer av aspergillos: allergisk bronkopulmonell aspergillos, allergisk bihåleinflammation, aspergillom och kronisk lungaspergillos. De huvudsakliga symptomen är hosta och andfåddhet. Eftersom dessa symptom är ospecifika baseras diagnosen på en kombination av kliniska, radiologiska, biologiska och mykologiska kriterier. Serologi är ett viktigt kriterium och flera metoder är tillgängliga för screening, uppföljning och bekräftelse.

Princip och presentation:

Kitet ger alla material som behövs för att utföra 96 Enzymkopplad immunadsorberande analys (ELISA) på ömtåliga 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*.

Specifika antikroppar i testet kommer att binda dessa antigener och tvättning kommer ta bort ospecifika antikroppar. Närvaron av fungal specifika serum antikroppar är upptäckt med Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat. Ett andra tvättsteg kommer att avlägsna obundet konjugat. Återgivning av bundna antikroppar görs genom tillsats av pNPP-substrat som blir gult i närvaro av alkaliskt fosfatas. Färgintensiteten är proportionell mot mängden av *Aspergillus fumigatus* specifika antikroppar i provet. Kaliumfosfat tillsättes för att stoppa reaktionen. Absorbans vid 405 nm läses med användning av en ELISA-mikroplatta läsare.

Testet kan utföras med automatiska system, men detta måste valideras av användaren.

Material som ingår i kitet (96 provningar):

WELL	6100-01	Brytbara ELISA remsor sensibiliserade med <i>Aspergillus fumigatus</i> antigener	96	brunnar
DILB	6100-02	Spädningsbuffert (10 x) koncentrat, färgad lila	50	ml
WASH	6100-03	Tvättlösning (10 x) koncentrat	50	ml
ENZB	6100-04	Enzymlösning	50	ml
STOP	6100-05	Stopplösning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negativt kontrollserum (20 x), grönt lock	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Svag positivt serum (avskuren, 20 x), gult lock	200	µl
CONTROL +	6100-08	Positivt kontrollserum (20 x), rött lock	200	µl
CONJ	6100-09	Protein A - alkaliskt fosfatas konjugat (50 x), lila lock	300	µl
SUBS	6100-10	Fosfatas substrat (para-nitrofenylfosfat)	20	tabletter
		Multipipett reservoar, 25 ml	1	styck
		Ram för ELISA 8-brunnhållare	1	styck

Hållbarhetstid och lagring:

Förvara kitet vid 2° till 8°C (transportera vid omgivningstemperatur). Undvik långvarig exponering av komponenterna för direkt ljus. Utgångsdatumet och partinumret av kitet anges på sidan av lådan. Efter första öppningen är alla reagens stabila till och med utgångsdatumet när de lagras vid 2-8°C.

Utrustning som behövs men inte medföljer med kitet:

Pipetter (ml och µl). Kolvar. Rör för spädning av sera. Limtejp för att täcka över brunnarna under inkubationen. Destillerat vatten. Inkubator inställd på 37°C. ELISA läsare inställd på 405 Nm. Manuell eller automatisk utrustning för sköljning av brunnar. Vortex-blandare. Timer.

Preparationer av reagens innan användning:

Få alla reagens till rumstemperatur och blanda före användning.

ELISA brunnar: öppna sidan av aluminium väskan 6100-01 och ta bort antal brunnar som behövs (en för blank, tre för kontroller, plus antal prov). 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.

Spädningsbuffert: utspädd spädningsbuffert (10 x) koncentrat 6100-02, 1/10 i destillerat vatten. Detta används för utspädning av kontroller, prover och konjugat. Den utspädda bufferten är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Tvättlösning: utspädd tvättlösning (10 x) koncentrat 6100-03, 1/10 i destillerat vatten. Använd också din egen tvättlösning. Undvik buffert som innehåller fosfat som kan hindra enzymatisk aktivitet av alkalisk fosfatas. Den utspädda tvättlösningen är stabil i 2 månader vid 2-8°C.

Kontrollsera: utspädd 10 µl kontrollsera 6100-06 till -08 i 190 µl spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/20). Det utspädda kontrollsera är stabilt i 2 månader vid 2-8°C.

Konjugat: utspädd konjugat 6100-09 i spädningsbuffertlösning (slutlig utspädning 1/50). Späd konjugat på dagen för analysen. Förvara inte utspätt konjugat.

Substratlösning: upplös tabletter av fosfatas substrat 6100-10 i utspädd buffert 6100-04 (1 tablett i 2,5 ml buffert). Skaka tills fullständig upplösning av tablett/erna. Späd substratet på analysdagen och skydda röret från direkt ljus. Tabletter och substratlösningar borde vara färglösa, eller bara ha en ljusgul skiftning. Om en tablett eller en substratlösning blir gul kan den ha delvis hydrolyserats och bör kasseras. Förvara inte substratlösningen.

Stopplösning: använd reagens 6100-05 utspädd.

Provtagning och förberedning

Använd humant-serum. Serum bör förvaras vid 2-8°C om det analyseras inom några dagar, annars lagras vid -20°C eller lägre. Undvik upprepade frysning och upptining.

Vortexprover och späd 1/201 i spädningsbuffertlösning (t.ex. 5 µl prov i 1,0 ml).

Varningar och säkerhetsåtgärder:

Giftiga föreningar finns i följande koncentration:

Komponent	Referens	Natriumazid (N _a N ₃)	Mertiolat
Spädningsbuffert (10 x)	6100-02	0,1%	0,02%
Tvättlösning (10 x)	6100-03	0,05%	/
Enzybuffert	6100-04	0,01%	/
Kontrollsera (20 x)	6100-06 till -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	6100-09	0,1%	/

Vid de använda koncentrationerna har natriumazid och merthiolat ingen toxikologisk risk vid kontakt med hud och slemhinnor.

- Stopplösningen 6100-05 (0.5 M K₃PO₄) är irriterande.
- Dem negativa, svagt positiva, och positiva kontrollsera (6100-06 till -08) är från kaniner.
- Behandla alla reagens och prov som potentiellt infektiöst material.
- Byt inte reagenser av olika partier eller Bordier ELISA-kit.
- Använd inte reagenser från andra tillverkare med reagens i denna utrustning.
- Använd inte reagens efter dess utgångsdatum.
- Stäng reagensflaskorna tätt omedelbart efter användning, och byt inte ut skruvlock för att undvika förorening.
- Använd separata och rena pipetter-tips för varje prov.
- Återanvänd inte mikrobrunnar.
- Undvik försämring av mikrobrunnarna genom mekanisk verkan (spetsar/koner, munstycken).
- Beskrivningarna av symboler som används på etiketterna finns på webbplatsen www.bordier.ch.

Avfallshantering:

Alla material som används för detta test anses allmänt som farligt avfall. Se nationella och regionala lagar och förordningar för bortskaffande av farligt avfall.

Procedur:

Vid körning av analysen, undvik bildandet av bubblor i brunnarna.

Steg 1: Blockering:

Fyll brunnarna helt med spädningsbuffertlösning.

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

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

Steg 2: Inkubation med prover:

Fyll den första brunnen i remsan med 100 µl spädningsbuffert (inget serumblankt).

Fyll dem efterföljande tre brunnarna med respektive 100 µl utspädd negativ, svagt positiv (avskuren) och positiv kontrollsera. För analyser av mer än 25 prover rekommenderar vi att fylla de tre sista brunnarna med kontrollsera som ett duplikat.

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

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

Ta bort sera och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 3: Inkubation med konjugat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn (inklusive det inget serumblankt).

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

Ta bort konjugat och tvätta 4 x med ~ 250 µl tvättlösning.

Steg 4: Inkubation med substrat:

Fördela 100 µl substratlösning per brunn.

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

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

Steg 5: Mätning av absorbanser:

Om det behövs, torka botten av brunnarna och eliminera bubblor. Mät absorbanserna vid 405 Nm inom 1 timme efter tillsatsen av stopplösning.

Förklaring:

Subtrahera värden av inget serumblankt från alla mätvärden. Beräkna de genomsnittliga absorbansvärdena för duplicerade serumkontroller när det är tillämpligt. Testet är giltigt om dem påföljande kriterierna uppfylls:

- absorbans (A) av positiv kontroll > 1,200
- A av svagt positiv kontroll > 11% av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 8% av A av positiv kontroll
- A av inget serumblankt < 0,350

Kvalitetskontroll av nuvarande partier publiceras på vår hemsida: www.bordier.ch.

Antikropps-koncentrationen av den svagt positiva (avskuren) serum 6100-07 har ställts in för att optimalt skilja mellan sera från kliniskt dokumenterade fall av aspergillos i immunkompetenta patienter och friska humana sera och friska humana sera. Det skilda index av ett prov definieras efter subtraktion av det inget serumblankt ämne som:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorbans prov}}{\text{Absorbans avskilt serum}}$$

Resultatet är **negativ** när indexet av det analyserade provet är lägre än **0,8**. I detta fall, IgG antikropps-koncentrationen mot **Aspergillus fumigatus** antigener är kliniskt icke signifikant.

En grå yta motsvarar ett index som ligger mellan **0,8** och **1,0**. I detta fall betraktas provet som gränslinje. Det rekommenderas att repetera testet med samma prov, eller med ett nytt serum av samma patient, som tas 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** antigener är kliniskt icke signifikant. Detta resultat leder till en aspergillos eller en aspergillos sensibilisering.

Vid positivt eller tveksamt resultat rekommenderar vi att du utför ett bekräftelsetest (oftast med western blot) om ett sådant test är tillgängligt eller krävs enligt nationella bestämmelser.

Analytiska prestationer:

Analytisk specificitet:

Man fann en sensitivitet på 22% med 9 sera från 5 patienter med invasiv aspergillos. För immunsupprimerade patienter rekommenderas att testet utförs med detektering av *A. fumigatus*-antigener i serum. Man fann en specificitet på 97% i 36 sera från 24 patienter med icke aspergillusorsakade luftvägssjukdomar (candidiasis, tuberkulos, pneumocystisinfektioner och kryptokockos).

Ingen positiv eller negativ interferens sågs när sera tillsatts suprafysiologiska koncentrationer av hemoglobin, lipider eller bilirubin.

Noggrannhet:

Repeaterbarhet 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.

	Repeaterbarhet		Reproducerbarhet	
	Prov 1	Prov 2	Prov 1	Prov 2
Genomsnitt (absorbans)	0,352	1,767	0,410	1,985
Standardavvikelse (absorbans)	0,027	0,069	0,038	0,096
Variationskoefficient (%)	7,6	3,9	9,3	4,8

Följande prestationer kan inte utvärderas eftersom det inte finns något certifierat referensmaterial för denna analys:

- Analytisk känslighet (gränser för detektion och kvantifiering)
- Noggrannhet
- Sannhet
- Mätområde
- Linjäritet

Kliniska prestationer:

Diagnostisk känslighet:

Man fann en sensitivitet på 97 % i 230 sera från 147 patienter med olika aspergilloser (104 fall av kronisk pulmonell aspergillos (inklusive 17 aspergillom) och 43 fall av allergisk bronkopulmonell aspergillos).

Diagnostisk specificitet:

Man fann en specificitet på 90 % i 206 sera från 205 patienter med luftvägssymtom hos vilka en *Aspergillus*-relaterad sjukdom hade uteslutits.

Positivt och negativt prediktivt värde:

Man fann ett PPV på 92% och ett NPV på 96% i ovannämnda populationer.

Förväntade värden i normala och drabbade populationer:

I en normalpopulation bestående av 99 schweiziska blodgivare, i 98 sera från en schweizisk infektionsenhet och 90 sera från patienter med misstänkt aspergillos, men där denna sjukdom med säkerhet har uteslutits, är det förväntade indexvärdet 0,16. I en infekterad population med 63 sera från patienter som lider av olika aspergilloser är det förväntade indexvärdet 2,16.

Incidenter:

Varje allvarlig incident som inträffar i samband med produkten ska anmälas till tillverkaren och till den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten är etablerad.

Begränsningar:

Diagnos av en infektionssjukdom bör inte upprättas på grundval av ett enda testresultat. En noggrann diagnos bör ta hänsyn till endemisk situation, klinisk historia, symptomatologi, bildbehandling och serologiska data. Hos immunförsvagade patienter och nyfödda är serologiska data av begränsat värde.

Referenser:

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 aspergillos 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 aspergillos. 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 aspergillos. J. Microbiol. Methods 176.



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

