

ASPERGILLUS FUMIGATUS

Immuno-enzymatische test voor de diagnose van aspergillose door *A. fumigatus* bij mensen

96 testen op deelbare strips bedoeld voor in-vitro diagnostisch en professioneel laboratoriumgebruik

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



Wordt gebruikt voor:

De ELISA-kit voor *Aspergillus fumigatus* van Bordier is bedoeld voor kwantitatieve detectie van IgG-antilichamen tegen *Aspergillus fumigatus* in humaan serum. Serologie is een hulpmiddel bij diagnose en kan niet gebruikt worden als enige manier van diagnostisering. Deze test is tevens bedoeld voor de follow-up van patiënten met een verhoogd risico op aspergillose.

Achtergrond:

Pulmonaire aspergillose wordt veroorzaakt door verschillende pathogene soorten van de schimmelgenus *Aspergillus*, met *Aspergillus fumigatus* als de belangrijkste veroorzaker. Dit pathogeen zit in de grond en rottend organisch materiaal. Mensen ademen honderden sporen per dag in, maar alleen degenen met risicofactoren zullen de diverse vormen van aspergillose ontwikkelen: allergische bronchopulmonaire aspergillose, allergische sinusitis, aspergilloma en chronische pulmonaire aspergillose. De belangrijkste symptomen zijn hoesten en kortademigheid. Aangezien het specifieke symptomen betreft, berust diagnostiseren op een combinatie van klinische, radiologische, histologische en mycologische criteria. Serologie is een belangrijk criterium en meerdere methodes zijn beschikbaar voor screening, follow-up en bevestiging.

Principe en presentatie:

De kit bevat al het materiaal dat nodig is voor 96 gekoppelde immuno-enzymatische testen (ELISA test) op deelbare microtitratiestripjes die gesensibiliseerd zijn met het volgende mengsel:

- Oplosbare somatische en metabole *Aspergillus fumigatus*-antigenen
- Recombinante antigenen: dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsine) en ribonuclease (mitogilline) van *Aspergillus fumigatus*

Specifieke antilichamen in het monster binden zich aan deze antigenen en door wassen worden onspecifieke antilichamen verwijderd. De aanwezigheid van mycose-specifieke antilichamen wordt gedetecteerd met een Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat. Middels een tweede wasbeurt wordt ongebonden conjugaat verwijderd. Om gebonden antilichamen te detecteren wordt pNPP-substraat toegevoegd, dat bij aanwezigheid van alkalinefosfatase geel kleurt. Kleurintensiteit is in proportie met de hoeveelheid *A. fumigatus*-specifieke antilichamen in het monster. Na toevoegen van kaliumfosfaat stopt de reactie. Absorptie bij 405 nm wordt gelezen met gebruik van een ELISA-microplaatlezer.

De test kan uitgevoerd worden met geautomatiseerde systemen, maar dit moet gevalideerd worden door de gebruiker.

Materiaal aanwezig in de kit (96 tests):

WELL	6100-01	Deelbare ELISA strips, gesensibiliseerd met <i>Aspergillus fumigatus</i> -antigenen	96	cupjes
DILB	6100-02	Verdunningsbuffer (10 x geconcentreerd), paars van kleur	50	ml
WASH	6100-03	Wasvloeistof (10 x geconcentreerd)	50	ml
ENZB	6100-04	Enzymbuffer	50	ml
STOP	6100-05	Stopoplossing (0,5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negatief controleserum (20x), groene dop	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Zwak-positief controleserum (drempel, 20 x), gele dop	200	µl
CONTROL +	6100-08	Positief controleserum (20 x), rode dop	200	µl
CONJ	6100-09	Proteïne A - alkalische-fosfataseconjugaat (50 x), paarse dop	300	µl
SUBS	6100-10	Fosfatasesubstraat (para-nitrofenylfosfaat)	20	tabletten
		Multipipet reservoir, 25 ml	1	stuks
		Kader voor ELISA 8-cupjeshouder	1	stuks

Bewaar condities:

Bewaar de kit bij 2-8°C (transport bij kamertemperatuur), vermijd langdurige blootstelling van de bestanddelen aan direct licht. Vervaldatum en productienummer van de kit staan vermeld op de zijkant van de doos. Na openen zijn alle reagens tot aan de vervaldatum stabiel, mits bewaard bij 2-8°C.

Benodigd materiaal niet geleverd met de kit:

Pipetten (ml en µl). Bakjes. Verdunningstubes voor sera. Plakband voor afdekken van de stripjes tijdens incubatie. Gedestilleerd water. Incubator afgesteld op 37°C. ELISA lezer afgesteld op 405 nm. Handmatige of geautomatiseerde apparatuur voor het afspoelen van de cupjes. Vortexmixer. Timer.

Vorbereiding van de reagens:

Laat alle reagens op kamertemperatuur komen en vermeng voor gebruik.

ELISA strips: open de zijkant van aluminiumzak 6100-01 en neem het aantal benodigde strips eruit (eentje voor blanco-controle, drie voor controles, plus het aantal monsters). Plaats de gesensibiliseerde strips in de 8-cupjeshouder(s). Vul de lege plekken van de houder zo nodig met gebruikte cupjes. Plaats de houder(s) in de juiste richting in de lijst. Hersluit de geopende verpakking met silicagel kussentje.

Verdunningsbuffer: verdun de geconcentreerde verdunningsvloeistof (10 x) 6100-02, 1:10 met gedestilleerd water. Dit wordt gebruikt voor verdunning van controles, monsters en conjugaat. De verdunningsvloeistof is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Wasoplossing: verdun de geconcentreerde wasoplossing (10 x) 6100-03, 1:10 met gedestilleerd water. U kunt ook uw eigen wasoplossing gebruiken. Vermijd het gebruik van fosfaat-houdende buffers, aangezien dit de enzymatische activiteit van alkalische fosfatase kan verhinderen. De verdunde wasvloeistof is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Controlesera: verdun 10 µl controlesera 6100-06 tot -08 in 190 µl verdunningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:20). Het verdunde controleserum is bij 2-8°C gedurende 2 maanden stabiel.

Conjugaat: verdun conjugaat 6100-09 met verdunningsbuffer (uiteindelijke verdunning 1:50). Verdun conjugaat op de testdag zelf. Het verdunde conjugaat niet bewaren.

Substraatoplossing: los de tablet(ten) fosfatasesubstraat 6100-10 op in de onverdunde enzymbuffer 6100-04 (1 tablet in 2,5 ml buffer). Vortex tot de tablet(ten) volledig is/zijn opgelost. Verdun het substraat op de testdag zelf en bescherm het buisje tegen direct licht. Tabletten en substraatoplossingen dienen kleurloos of hooguit lichtgeel van kleur te zijn. Kleurt een tablet of substraatoplossing geel, dan kan het deels gehydrolyseerd zijn en dient weggegooid te worden. De substraatoplossing niet bewaren.

Stopoplossing: gebruik reagens 6100-05 onverdund.

Monstercollectie en voorbereiding:

Gebruik humaan serum. Als het serum binnen enkele dagen geanalyseerd wordt dient het bewaard te worden bij 2-8°C, zo niet, dan bewaren bij -20°C of lager. Vermijd herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Vortex de monsters en verdun tot 1:201 in verdunningsbuffer (bijv. 5 µl monster in 1,0 ml).

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen:

Toxische bestanddelen in de volgende concentraties:

Bestanddeel	Referentie	Natriumazide (N _a N ₃)	Thiomersal
Verdunningsbuffer (10 x)	6100-02	0.1 %	0.02 %
Wasoplossing (10 x)	6100-03	0.05 %	/
Enzymbuffer	6100-04	0.01 %	/
Controlesera (20 x)	6100-06 to -08	0.1 %	0.02 %
Conjugaat (50 x)	6100-09	0.1 %	/

In de gebruikte concentraties zijn er voor natriumazide en thiomersal geen toxicologische risico's als gevolg van aanraking met huid of slijmvliezen.

- Stopoplossing 6100-05 (0,5 M K₃PO₄) kan irritatie geven.
- De negatieve, zwak-positieve en positieve controlesera (6100-06 tot -08) zijn afkomstig van konijnen.
- Behandel alle reagens en monsters als potentieel geïnfecteerd materiaal.
- Gebruik niet de reagens van andere partijen of andere Bordier ELISA-kits.
- Gebruik geen reagens van andere fabrikanten met reagens voor deze kit.
- Gebruik geen reagens waarvan de vervaldatum is verlopen.
- Sluit de ampullen reagens direct na gebruik stevig af. Gebruik voor elk ampul uitsluitend de bijbehorende dop (niet de dop van andere ampullen). Dit om verontreiniging te voorkomen.
- Gebruik voor elk monster een eigen en schoon pipettipje.
- De microcupjes niet hergebruiken.

Wegwerpbeleid:

Alle materialen zoals gebruikt bij deze test worden gezien als gevaarlijke afvalstoffen. Raadpleeg de landelijke en regionale wet- en regelgeving voor het verwijderen van gevaarlijk afval.

Methode:

Voorkom tijdens de testfase luchtbelvorming in de cupjes.

Stap 1: Blokkage:

Vul de cupjes volledig met verdunningsbuffer.

Incubeer gedurende 5 tot 15 minuten bij kamertemperatuur (blokkage).

Verwijder de verdunningsbuffer door afzuigen of leegschudden van de cupjes boven de gootsteen.

Stap 2: Incubatie met de monsters:

Vul het eerste cupje van de eerste strip met 100 µl verdunningsbuffer (serumvrije blanco).

Vul de volgende 3 cupjes met respectievelijk 100 µl verdund negatief, zwak-positief (drempel) en positief controleserum. Voor testen met meer dan 25 monsters is het advies om de drie laatste cupjes als duplicaat met controlesera te vullen.

Vul de resterende cupjes met de verdunde monsters (100 µl per stuk).

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

Verwijder de sera en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 3: Incubatie met conjugaat:

Vul elk cupje (inclusief serumvrije blanco) met 100 µl verdund conjugaat.

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

Verwijder het conjugaat en was 4 x met ~ 250 µl wasoplossing.

Stap 4: Incubatie met substraat:

Vul elk cupje met 100 µl substraatoplossing.

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

Stop de reactie door aan elk cupje 100 µl stopoplossing toe te voegen.

Stap 5: Meting van de absorptie:

Droog zo nodig de onderkant van de cupjes en verwijder luchtbelletjes. Meet absorptie bij 405 nm binnen 1 uur na toevoegen van de stopoplossing.

Interpretatie:

Trek de waarde van de serumvrije blanco-controle van alle gemeten waardes af. Bereken indien van toepassing de gemiddelde absorptiewaarde van de herhaalde serumcontroles. De test is betrouwbaar als deze aan de volgende criteria voldoet:

- absorptie (A) van de positieve controle > 1200
- A van de negatieve controle < 10 % van A van de positieve controle
- A van de blank tegenover lucht < 0,350.

Kwaliteitscontroles van de huidige partijen kunt u vinden op onze website: www.bordier.ch.

De titer van het zwak-positief serum 6100-07 (drempel) wordt vastgesteld om het verschil tussen klinisch gedocumenteerde gevallen van aspergillose bij immuuncompetente patiënten en normaal menselijk serum optimaal te duiden. De drempelwaarde van een monster wordt, na aftrekken van de serumvrije blanco, als volgt gedefinieerd:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorptie monster}}{\text{Absorptie zwak-positief (drempel) serum}}$$

Het resultaat is **negatief** als de index van het geanalyseerde monster lager is dan **0,8**. In dat geval is de titer van de IgG-antilichamen tegen ***Aspergillus fumigatus***-antigenen klinisch niet significant.

Een grijs gebied correspondeert met een index tussen **0,8** en **1,0**. In dat geval wordt het monster gezien als borderline en is het advies om de test met hetzelfde monster of een nieuw serum van dezelfde patiënt 2-4 weken later te herhalen.

Het resultaat is **positief** als de index van het geanalyseerde monster hoger is dan **1,0**. In dat geval wordt de titer van de IgG-antilichamen tegen ***Aspergillus fumigatus***-antigenen als klinisch significant gezien. Dit leidt tot de diagnose aspergillose of aspergillose-gevoeligheid.

Sensibiliteit en specificiteit:

Een gevoeligheid van 97% werd gevonden bij 230 sera van 147 patiënten met diverse vormen van aspergillose (104 chronische pulmonaire aspergillose (inclusief 17 met aspergilloma) en 43 met allergische bronchopulmonaire aspergillose). Een specificiteit van 90% werd gevonden bij 206 sera van 205 patiënten met respiratoire symptomen bij wie een *Aspergillus*-gerelateerde ziekte werd uitgesloten.

Interferenties:

Een interne studie heeft aangetoond dat hemolytische, lipemische of icterische sera geen invloed hebben op de testresultaten.

Precisie:

Herhaalbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 humane sera in 24 cupjes in één enkel experiment.

Reproduceerbaarheid werd geëvalueerd door testen van 2 monsters bij 10 verschillende experimenten.

	Herhaalbaarheid		Reproduceerbaarheid	
	Monster 1	Monster 2	Monster 1	Monster 2
Gemiddeld (absorptie)	0.352	1.767	0.410	1.985
Standaardafwijking (absorptie)	0.027	0.069	0.038	0.096
Variatiecoëfficiënt (%)	7.6	3.9	9.3	4.8

Beperkingen:

Een gevoeligheid van 22% werd gevonden bij 9 sera van 5 patiënten met invasieve aspergillose. In geval van patiënten met immundeficiëntie is het advies om de test te doen met detectie van *A. fumigatus*-antigenen in serum. Een specificiteit van 97% werd gevonden bij 36 sera van 24 patiënten met niet-aspergillus-gerelateerde respiratoire aandoeningen (candida, tuberculose, pneumocystose, en cryptokokkose).

Eén enkele testuitslag is niet voldoende om een infectieziekte te diagnosticeren. Een exacte diagnose dient tevens rekening te houden met de endemische context, klinische voorgeschiedenis, symptomatologie, beeldvorming en serologische data.

De waarde van serologische data bij pasgeborenen en patiënten met immunodeficiëntie is beperkt.

Referenties:

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 aspergillosis. *Diag. Microbiol. Inf. Disease* **55**, 279-291.

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.

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

