

# Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Encimski imunski test za diagnozo aspergiloze pri ljudeh z *Aspergillus fumigatus*

96 testov na posameznih vdolbinicah za diagnostično in vitro uporabo in za profesionalno laboratorijsko uporabo



Navodila za uporabo artikla št. 6100  
Uredba ES št.: CH-201301-0006 - UDI-DI: 07640158216101



## Predvidena uporaba:

Komplet Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA je namenjen kvantitativnemu odkrivanju protiteles IgG proti *Aspergillus fumigatus* v človeškem serumu. Serologija je pomoč pri diagnosticiranju in je ni mogoče uporabiti kot edino diagnostično metodo. Ta test je namenjen tudi spremljanju bolnikov s tveganjem za okužbe z aspergilozo.

## Ozadje:

Pljučna aspergiloza je posledica različnih patogenih vrst gliv iz rodu *Aspergillus*, med katerimi je najpogosteje vpletena *Aspergillus fumigatus*. Ta patogen se nahaja v tleh in razpadajočih organskih snoveh. Ljudje vdihnejo na stotine spor na dan, vendar bodo samo osebe z dejavniki tveganja razvile različne vrste aspergiloze: alergijsko bronhopulmonalno aspergilozo, alergijski sinusitis, aspergilom in kronično pljučno aspergilozo. Glavna simptoma sta kašelj in zadihanost. Ker sta ta simptoma nespecifična, diagnoza temelji na kombinaciji kliničnih, radioloških, bioloških in mikoloških meril. Serologija je pomembno merilo in na voljo je več metod za presejevanje, spremljanje in potrditev.

## Načelo in predstavitev:

Komplet vsebuje ves material, ki je potreben za izvedbo 96 encimsko vezanih imunskih testov (ELISA) na lomljivih mikrotitracijskih vdolbinicah, senzibiliziranih z naslednja mešanica:

- Topni somatski in presnovni antigeni *Aspergillus fumigatus*.
- Rekombinantni antigeni: dipeptidilpeptidaza tipa V (kimotripsin) in ribonukleaza (mitogilin) pri *Aspergillus fumigatus*.

Specifična protitelesa v vzorcu se bodo vezala na te antigene in pranje bo odstranilo nespecifična protitelesa. Prisotnost specifičnih protiteles proti glivicam se odkrije z beljakovino A in alkalne fosfataze. Drugi korak pranja bo odstranil nevezani konjugat. Odkrivanje vezanih protiteles naredimo z dodatkom substrata pNPP, ki v prisotnosti alkalne fosfataze porumeni. Intenzivnost barve je sorazmerna s količino specifičnih protiteles *Aspergillus fumigatus* v vzorcu. Za zaustavitev reakcije je dodan kalijev fosfat. Absorbanco pri 405 nm se odčitava z bralnikom mikroplošč ELISA.

Test se lahko izvaja z avtomatskimi sistemi, vendar mora takšno izvedbo uporabnik potrditi.

## Material v kompletu (96 testov):

<b>WELL</b>	6100-01	Lomljivi lističi ELISA, senzibilizirani z antigeni <i>Aspergillus fumigatus</i>	96	vdolbinic
<b>DILB</b>	6100-02	Puferski koncentrat za redčenje (10 x), obarvan vijolično	50	ml
<b>WASH</b>	6100-03	Koncentrat raztopine za pranje (10 x)	50	ml
<b>ENZB</b>	6100-04	Encimski pufer	50	ml
<b>STOP</b>	6100-05	Raztopina za zaustavitev (0.5M K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	25	ml
<b>CONTROL -</b>	6100-06	Negativni kontrolni serum (20 x), zeleni pokrovček	200	µl
<b>CONTROL -/+</b>	6100-07	Šibek pozitivni kontrolni serum (mejni, 20 x), rumeni pokrovček	200	µl
<b>CONTROL +</b>	6100-08	Pozitivni kontrolni serum (20 x), rdeči pokrovček	200	µl
<b>CONJ</b>	6100-09	Protein A – konjugat alkalne fosfataze (50 x), vijolični pokrovček	300	µl
<b>SUBS</b>	6100-10	Substrat fosfataze (para-nitrofenilfosfat)	20	tablet
		Rezervoar za multipipeto, 25 ml	1	kos
		Okvir za nosilec ELISA, 8 vdolbinic	1	kos

## Rok uporabnosti in shranjevanje:

Komplet hranite pri 2° do 8°C (transport pri sobni temperaturi), izogibajte se dolgotrajnemu izpostavljanju komponent neposredni svetlobi. Rok uporabnosti in številka serije kompleta sta natisnjena na stranici škatle. Po prvem odprtju so vsi reagenti stabilni do izteka roka uporabnosti, če jih shranjujete pri 2-8°C.

### Potrebna oprema, ki pa ni priložena kompletu:

Pipete (ml in µl). Bučke. Epruvete za redčenje. Lepilni trak za prekrivanje vdolbinic med inkubacijo. Destilirana voda. Inkubator nastavite na 37°C. Čitalnik ELISA, nastavljen na 405 nm. Ročna ali avtomatska oprema za izpiranje vdolbinic. Vorteks mešalnik. Časovnik.

### Priprava reagentov pred uporabo:

Vse reagente segrejte na sobno temperaturo in jih pred uporabo premešajte.

**Vdolbinice ELISA:** odprite stran aluminijaste vrečke 6100-01 in odstranite potrebno število vdolbinic (eno za prazno, tri za kontrole ter določeno število vzorcev). Senzibilizirane vdolbinice postavite v držala z 8 vdolbinicami. Po potrebi dopolnite prazne položaje v držalu z uporabljenimi vdolbinicami. Vstavite držalo(-a) v okvir v pravilni orientaciji. Ponovno zaprite odprto pakiranje z blazinico za sušenje.

Pufer za redčenje: razredčite puferski koncentrat za redčenje (10 x) 6100-02, 1/10 v destilirani vodi. Ta se uporablja za redčenje kontrol, vzorcev in konjugata. Razredčeni pufer je pri 2-8°C stabilen 2 meseca.

**Raztopina za pranje:** razredčeni koncentrat raztopine za pranje (10 x) 6100-03, 1/10 v destilirani vodi. Uporabite lahko tudi svojo raztopino za pranje. Izogibajte se pufrom, ki vsebujejo fosfat, ki bi lahko zaviral encimsko aktivnost alkalne fosfataze. Razredčena raztopina za pranje je pri 2-8°C stabilna 2 meseca.

**Kontrolni serumi:** razredčite 10 µl kontrolnega seruma 6100-06 do -08 v 190 µl raztopine pufra za redčenje (končna razredčitev 1/20). Razredčeni kontrolni serumi so pri 2-8°C stabilni 2 meseca.

**Konjugat:** razredčite konjugat 6100-09 v raztopini pufra za redčenje (končna razredčitev 1/50). Konjugat razredčite na dan analize. Ne shranjujte razredčenega konjugata.

**Raztopina substrata:** raztopite tableto(-e) substrata fosfataze 6100-10 v nerazredčenem encimskem pufru 6100-04 (1 tableta v 2,5 ml pufra). Mešajte, dokler se tableta(-e) popolnoma ne raztopi(-jo). Na dan testa substrat razredčite in epruveto zaščitite pred neposredno svetlobo. Tablete in raztopine substratov morajo biti brezbarvne ali imeti le rahel rumen odtенок. Če se tableta ali raztopina substrata obarva rumeno, je morda delno hidrolizirana in jo je treba zavreči. Raztopine substrata ne shranjujte.

**Raztopina za zaustavitev:** uporabite nerazredčen reagent 6100-05.

### Zbiranje in priprava vzorcev:

Uporabite človeški serum. Serum je treba hraniti pri 2-8°C, če ga analiziramo v nekaj dneh, sicer ga hranite pri -20°C ali nižje. Izogibajte se ponavljajočemu zamrzovanju in odtajanju.

Vzorci premešajte in razredčite 1/201 v raztopini pufra za redčenje (na primer 5 µl vzorca v 1,0 ml).

### Opozorila in previdnostni ukrepi:

Strupene spojine najdemo v naslednjih koncentracijah:

Komponenta	Referenca	Natrijev azid (N <sub>a</sub> N <sub>3</sub> )	Mertiolat
Pufer za redčenje	6100-02	0,1%	0,02%
Raztopina za pranje (10 x)	6100-03	0,05%	/
Encimski pufer	6100-04	0,01%	/
Kontrolni serum (20 x)	6100-06 do -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	6100-09	0,1%	/

V uporabljenih koncentracijah natrijev azid in mertiolat ob stiku s kožo in sluznicami nimata toksikološkega tveganja.

- Raztopina za zaustavitev 6100-05 (0,5 M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) je dražilna.
- Negativni, šibko pozitivni in pozitivni kontrolni serumi (6100-06 do -08) so pridobljeni iz kuncev.
- Z vsemi reagenti in vzorci ravnajte kot s potencialno kužnim materialom.
- Ne zamenjajte reagentov različnih serij ali kompletov Bordier ELISA.
- Ne uporabljajte reagentov drugih proizvajalcev z reagenti tega kompleta.
- Ne uporabljajte reagentov po izteku roka uporabnosti.
- Takoj po uporabi dobro zaprite stekleničke z reagentom in v namen preprečevanja kontaminacije ne zamenjajte navojnih pokrovčkov.
- Za vsak vzorec uporabite ločene in čiste konice pipet.
- Mikrovdolbinic ne uporabljajte ponovno.
- Preprečite poškodbe mikrovdolbinic zaradi mehanskega delovanja (konice/stožci, šobe).
- Opise simbolov, uporabljenih na etiketah, lahko najdete na spletnem mestu [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

## Smernice za odstranjevanje:

Vsi materiali, uporabljeni za ta test, se na splošno štejejo za nevarne odpadke. Upoštevajte nacionalne in regionalne zakone in predpise za odstranjevanje nevarnih odpadkov.

## Postopek:

Pri izvajanju testa se izogibajte nastajanju mehurčkov v vdolbinicah.

### 1. korak: Blokiranje:

Vdolbinice popolnoma napolnite z raztopino pufru za redčenje.

Inkubacija znaša 5 do 15 minut pri sobni temperaturi (blokiranje).

Odstranite pufer za redčenje z aspiracijo ali s stresanjem vdolbinic nad koritom.

### 2. korak: Inkubacija z vzorci:

Prvo vdolbinico prvega lističa napolnite samo s 100 µl pufru za redčenje (prazni vzorec brez seruma).

Naslednje tri vdolbinice napolnite s po 100 µl razredčenega negativnega, šibko pozitivnega (mejnega) in pozitivnega kontrolnega seruma. Za analize več kot 25 vzorcev priporočamo, da zadnje tri vdolbinice napolnite s kontrolnimi serumi kot duplikatom.

Preostale vdolbinice napolnite z razredčenimi vzorci (po 100 µl).

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite serume in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

### 3. korak: Inkubacija s konjugatom:

V vsako vdolbinico (vključno s praznim vzorcem brez seruma) porazdelite 100 µl razredčenega konjugata.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Odstranite konjugat in 4 x operite s ~ 250 µl raztopine za pranje.

### 4. korak: Inkubacija s substratom:

Porazdelite 100 µl raztopine substrata na vdolbinico.

Vdolbinice prekrijte z lepilnim trakom in inkubirajte 30 minut pri 37°C.

Zaustavite reakcijo z dodatkom 100 µl raztopine za zaustavitev v vsako vdolbinico.

### 5. korak: Merjenje absorbanc:

Po potrebi obrišite dno vdolbinic in odstranite mehurčke. Izmerite absorbance pri 405 nm v 1 uri po dodatku raztopine za zaustavitev.

## Interpretacija:

Od vseh izmerjenih vrednosti odštejte vrednost praznega vzorca brez seruma. Po potrebi izračunajte povprečne vrednosti absorbance podvojenih serumskih kontrol. Test je veljaven, če so izpolnjena naslednja merila:

- Absorbanca (A) pozitivne kontrole > 1,200
- A šibke pozitivne kontrole > 11% A pozitivne kontrole
- A negativne kontrole < 8% A pozitivne kontrole
- A praznega vzorca brez seruma < 0,350

Kontrole kakovosti trenutnih serij so objavljene na naši spletni strani [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch).

Za optimalno razlikovanje med serumi klinično dokumentiranih primerov aspergiloze pri imunsko kompetentnih bolnikih in serumi zdravih ljudi je bila določena koncentracija protiteles v šibko pozitivnem (mejnem) serumu 6100-07. Mejni indeks vzorca je po odštevanju praznega vzorca brez seruma opredeljen kot:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{vzorec absorbance}}{\text{mejni serum absorbance}}$$

Rezultat je **negativen**, če je indeks analiziranega vzorca nižji od **0,8**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom *Aspergillus fumigatus* klinično nepomembna.

Sivo območje ustreza indeksu med **0,8 in 1,0**. V tem primeru se vzorec obravnava kot mejni, zato je priporočljivo ponoviti test z istim vzorcem ali z novim serumom istega bolnika, odvzetim po 2-4 tednih.

Rezultat je **pozitiven**, če je indeks analiziranega vzorca višji od **1,0**. V tem primeru je koncentracija protiteles IgG proti antigenom *Aspergillus fumigatus* klinično pomembna. Ta rezultat vodi do aspergiloze ali preobčutljivosti za *Aspergillus*.

V primeru pozitivnega ali dvomljivega rezultata priporočamo izvedbo potrditvenega testa (najpogosteje z western blotom), če je tak test na voljo ali ga zahtevajo nacionalni predpisi.

## Analitične zmogljivosti:

### Analitična specifičnost:

Pri 9 serumih 5 bolnikov z invazivno aspergilozo je bila ugotovljena 22-odstotna občutljivost testa. Pri bolnikih z oslabiljenim imunskim sistemom je priporočljivo, da se test zaključi z odkrivanjem antigenov *A. fumigatus* v serumu. Pri 36 serumih 24 bolnikov z neaspergilnimi boleznimi dihal (kandidiaza, tuberkuloza, pnevmocistoza in kriptokokoza) je bila ugotovljena 97-odstotna specifičnost testa.

Pri suprafizioloških koncentracijah hemoglobina, lipidov ali bilirubina v serumih, dopoljenih z motečimi snovmi, ni bilo opaženih nobenih pozitivnih ali negativnih interferenc.

### Natančnost:

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 24 vdolbinicah na 1 testu.

Ponovljivost je bila ocenjena s testiranjem 2 vzorcev človeškega seruma v 10 vdolbinicah na 10 različnih testih.

	Ponovljivost		Ponovljivost	
	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 1	Vzorec 2
<b>Povprečje (absorbanca)</b>	0,352	1,767	0,410	1,985
<b>Standardni odklon (absorbanca)</b>	0,027	0,069	0,038	0,096
<b>Koeficient variacije (%)</b>	7,6	3,9	9,3	4,8

Naslednjih zmogljivosti ni mogoče ovrednotiti, ker za to analizo ni certificiranega referenčnega materiala:

- Analitična občutljivost (meje zaznavnosti in kvantifikacije)
- Natančnost
- Resničnost
- Merilno območje
- Linearnost.

## Klinične zmogljivosti:

### Diagnostična občutljivost:

Pri 230 serumih 147 bolnikov z različnimi aspergilozami (104 kronične pljučne aspergiloze (vključno s 17 aspergilomi) in 43 alergijskih bronhopulmonalnih aspergiloz) je bila ugotovljena 97-odstotna občutljivost testa.

### Diagnostična specifičnost:

Pri 206 serumih 205 bolnikov z respiratornimi simptomi, pri katerih je bila izključena bolezen, povezana z *Aspergillusom*, je bila ugotovljena 90-odstotna specifičnost testa.

### Pozitivna in negativna napovedna vrednost:

Pri zgoraj omenjenih populacijah sta bila ugotovljena PPV 92% in NPV 96%.

### Pričakovane vrednosti pri zdravi in prizadeti populaciji:

Pri zdravi populaciji 99 švicarskih krvodajalcev, 98 serumov iz švicarske enote za infektologijo in 90 serumov bolnikov s sumom na aspergilozo, kjer pa je bila ta bolezen zagotovo izključena, je pričakovana indeksna vrednost 0,16. Pri prizadeti populaciji 63 serumov bolnikov z različnimi aspergilozami je pričakovana indeksna vrednost 2,16.

### Incidenti:

O vsakem resnem incidentu v zvezi s pripomočkom je treba obvestiti proizvajalca in pristojni organ države članice, v kateri ima uporabnik in/ali bolnik sedež.

### Omejitve:

Diagnoze nalezljive bolezni se ne sme postavljati na podlagi enega samega rezultata testa. Natančna diagnoza mora upoštevati endemično stanje, klinično anamnezo, simptomatologijo, slikanje in serološke podatke.

Pri bolnikih z oslabiljenim imunskim sistemom in novorojenčkih imajo serološki podatki omejeno vrednost.

### Reference:

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**.



## BORDIER AFFINITY PRODUCTS SA

Biokema building, Chatanerie 2, CH-1023 Crissier, Švica.

Telefon: + 41 21 633 31 67, Faks: + 41 21 633 31 78, [www.bordier.ch](http://www.bordier.ch)

