

Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Enzymimmunoassay zur Diagnose von humaner Aspergillose durch *Aspergillus fumigatus*

96 Tests in einzelnen Wells für die diagnostische in-vitro-Anwendung und im professionellen Laboreinsatz



BORDIER
AFFINITY
PRODUCTS

Gebrauchsanweisung für Artikel Nr. **6100**
EC reg. N°: CH-201301-0006 - UDI-DI: 07640158216101



Anwendungsgebiet:

Der Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA-Kit ist zum quantitativen Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *Aspergillus fumigatus* in humanem Serum bestimmt. Serologie ist eine Diagnosehilfe und kann nicht als allein stehende Methode zur Diagnosestellung verwendet werden. Der Test ist auch zur Nachuntersuchung von Patienten mit erhöhtem Aspergillose-Risiko geeignet.

Hintergrund-Informationen:

Pulmonale Aspergillose wird von verschiedenen pathogenen Spezies der Pilzgattung *Aspergillus* verursacht. Als häufigster Erreger ist dabei der *Aspergillus fumigatus* zu nennen. Dieser Pilz findet sich vor allem im Boden und im verwesenden organischen Material und wird von jedem täglich in hunderten von Sporen eingeatmet. Nur bei Menschen mit Risikofaktoren (Immunsuppression) entwickelt sich eine klinisch aktive Aspergillose, die in Form einer allergischen bronchopulmonalen Aspergillose, einer allergischen Sinusitis, eines Aspergilloms oder einer chronischen pulmonalen Aspergillose auftreten kann. Zu den wichtigsten Symptomen zählen dabei Husten und Kurzatmigkeit. Aufgrund dieser unspezifischen Symptomatik erfolgt die Diagnosestellung anhand einer Reihe von klinischen, radiologischen, biologischen und mykologischen Kriterien. Eine wichtige Rolle in der Diagnosestellung nehmen dabei serologische Untersuchungen ein, die beim Screening, bei Nachuntersuchungen und bei der Bestätigung der Diagnose eingesetzt werden können.

Testprinzip:

Die Testpackung enthält das komplette benötigte Material für einen Enzymimmunoassay (ELISA) auf einer 96er brechbaren Mikrotiterplatte, deren Wells mit den folgenden Antigenen beschichtet sind:

- Lösliches *Aspergillus fumigatus* Antigene (somatisch und metabolisch)
- Rekombinantes Antigen: Dipeptidyl Peptidase Typ V (Chymotrypsin) und Ribonuklease (Mitogillin) von *Aspergillus fumigatus*

Spezifische Antikörper werden sich an das Antigen anheften, wobei unspezifische Bestandteile durch Abwaschen entfernt werden können. Die Anwesenheit von IgG-Antikörpern im Serum wird mit einem Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat nachgewiesen. Beim wiederholten Abwaschen wird ungebundenes Konjugat entfernt. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgt mit pNPP-Substrat, der bei Kontakt mit alkalischer Phosphatase gelb wird. Die Farbintensität entspricht dabei der Menge von spezifischen *Aspergillus fumigatus*-Antikörpern in der Probe. Die Reaktion wird mit Dikaliumhydrogenphosphat unterbrochen. Zum Auslesen der Absorbanz bei 405 nm wird ein ELISA-Microplattenleser verwendet.

Eine Automatisierung des Tests ist möglich, muss aber vom Anwender validiert werden.

Kitbestandteile (96 Tests):

WELL	6100-01	Brechbare Mikrotiterplatten-Streifen, beschichtet mit <i>Aspergillus fumigatus</i> Antigen	96	wells
DILB	6100-02	Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat, violette Färbung	50	ml
WASH	6100-03	Waschpuffer (10 x) Konzentrat	50	ml
ENZB	6100-04	Enzympuffer	50	ml
STOP	6100-05	Stopp Lösung (0,5 M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negatives Kontroll-Serum (20 x), grüne Verschlusskappe	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Cut off / Schwach positives Kontroll-Serum (20 x), gelbe Verschlusskappe	200	µl
CONTROL +	6100-08	Positives Kontroll-Serum (20 x), rote Verschlusskappe	200	µl
CONJ	6100-09	Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat (50 x), violette Verschlusskappe	300	µl
SUBS	6100-10	Phosphatase Substrat (para-Nitrophenylphosphat)	20	Tabletten
		Multipipetten-Reservoir 25 ml	1	Stück
		Mikrotiterplattenhalter (8 Streifen)	1	Stück

Verfallsdatum und Lagerung:

Lagerung des Kits bei 2° bis 8°C (Transport bei Umgebungstemperatur). Die Komponenten sollten direktem Sonnenlicht nicht ausgesetzt werden. Das Verfallsdatum und die Chargennummer der Testpackung sind auf der Umverpackung seitlich aufgedruckt. Das Verfallsdatum nach dem Öffnen der Reagenzien ist bei einer Lagertemperatur von 2-8°C gültig.

Zusätzlich benötigte Materialien, nicht im Kit enthalten:

Pipetten (ml und µl). Messzylinder. Röhrchen zur Probenverdünnung. Folie um die Platten während der Inkubation abzudecken. Destilliertes Wasser. Inkubator 37°C. ELISA Reader mit Filter: 405 nm. Manuelle oder automatische Ausrüstung zum Spülen der Wells. Vortexmischer. Stoppuhr.

Vorbereitung der Reagenzien vor Benutzung:

Alle Reagenzien vor der Anwendung auf Raumtemperatur bringen und gut vermischen.

Mikrotiterstreifen: Den Aluminiumbeutel öffnen und die benötigte Anzahl der Streifen (6100-01) entnehmen (einen Teststreifen für die Blindprobe und drei Teststreifen für die Kontrollen plus die Anzahl der Proben). Die beschichteten Streifen im Mikrotiterplattenhalter platzieren. Auf die richtige Ausrichtung der Streifen im Rahmen achten. Die restlichen Streifen in dem wieder-verschliessbaren Beutel mit Trocknungsmittel aufbewahren.

Verdünnungspuffer: Verdünnungspuffer (10 x) Konzentrat 6100-02 mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Dies wird für die Verdünnung von Kontroll-Serum, Proben und Konjugaten verwendet. Der Verdünnungspuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Waschlösung: Waschpuffer (10 x) Konzentrat 6100-03, mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnen. Man kann einen im Labor vorhandenen Puffer als Waschlösung verwenden; der Puffer darf allerdings kein Phosphat enthalten. Der verdünnte Waschpuffer ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Kontroll-Serum: Je 10µl der Kontrollseren 6100-06 bis -08 mit 190 µl Verdünnungspuffer Lösung verdünnen (1:20 verdünnt). Das verdünnte Kontrollserum ist bei einer Temperatur von 2-8°C für den Zeitraum von 2 Monaten stabil.

Konjugat: Das Konzentrat 6100-09 wird mit Verdünnungspuffer Lösung, 1:50 verdünnt. Die Verdünnung des Konjugats muss am Tag der Probeentnahme stattfinden. Verdünntes Konjugat nicht lagern.

Substrat-Lösung: Die Substrattabletten 6100-10 in unverdünntem Enzympuffer 6100-04 (1 Tablette in 2,5 ml Puffer) auflösen, dabei gut mischen. Substrat am Tag der Probeentnahme verdünnen und vor direkter Sonneneinstrahlung schützen. Tabletten und Substratlösungen sollten eine leicht gelbliche oder keine Färbung aufweisen. Tabletten und Substrate mit einer gelben Färbung sollten aufgrund möglicher Hydrolyse entsorgt werden. Substratlösung nicht lagern.

Stopp-Lösung: Reagenz 6100-05 gebrauchsfertig.

Probenvorbereitung und -Lagerung:

Humanes Serum verwenden. Serum, das innerhalb von wenigen Tagen untersucht werden soll, sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Anderenfalls sollte es bei -20°C oder tiefer eingefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.

Probenmaterial mischen und 1:201 in Verdünnungspuffer Lösung auflösen (z.B. 5 µl Probe in 1,0 ml).

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen:

Die Mengen der giftigen Substanzen sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Komponente	Referenz	Natriumazid (NaN ₃)	Thiomersal
Verdünnungspuffer (10 x)	6100-02	0,1%	0,02%
Waschpuffer (10 x)	6100-03	0,05%	/
Enzympuffer	6100-04	0,01%	/
Kontrollserum (20 x)	6100-06 zu -08	0,1%	0,02%
Konjugat (50 x)	6100-09	0,1%	/

Natriumazid und Thiomersal in den angegebenen Konzentrationen sind bei Haut- oder Schleimhautkontakt nicht giftig.

- Die Stopp-Lösung 6100-05 (0,5 M K₃PO₄) ist reizend.
- Die Kontrollseren (6100-06 bis -08) wurden aus Kaninchen gewonnen.
- Alle Reagenzien und Proben sollten als potenziell ansteckendes Material behandelt werden.
- Reagenzien zwischen einzelnen Einheiten und Bordier ELISA-Kits nicht austauschen.
- Reagenzien anderer Hersteller nicht zusammen mit den Reagenzien aus diesem Kit verwenden.
- Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht verwenden.
- Reagenzflaschen unmittelbar nach Gebrauch dicht verschliessen. Flaschendeckel dürfen nicht vertauscht werden, um gegenseitige Kontamination zu vermeiden.
- Separate und saubere Pipettenspitzen für jede Patientenprobe verwenden.
- Mikrowells nur einmal verwenden.
- Vermeiden Sie eine Beschädigung der Mikrovertiefungen durch mechanische Einwirkungen (Kegel, Düsen).
- Die Beschreibungen der auf den Etiketten verwendeten Symbole finden Sie auf der Website www.bordier.ch.

Entsorgung:

Die in diesem Test verwendeten Materialien gelten als gefährliche Abfälle. Entsorgung gefährlicher Abfälle muss entsprechend den nationalen und regionalen Rechtsvorschriften stattfinden.

Durchführung:

Blasenbildung während des Nachweisverfahrens vermeiden.

Schritt 1: Blocking:

Die Wells komplett mit Verdünnungspuffer füllen.

5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (Blocking).

Verdünnungspuffer absaugen oder über einem Waschbecken abkippen.

Schritt 2: Inkubation mit Patientenproben:

In Well A1 100 µl Verdünnungspuffer pipettieren (serumfreier Blank).

In die nachfolgenden drei Wells jeweils 100 µl verdünnte negative, schwach-positive (Cut-off) und positive Kontroll-Seren pipettieren. Für Nachweisverfahren mit mehr als 25 Proben wird eine Duplikaterstellung mit den drei verbleibenden Wells empfohlen.

In die restlichen Wells jeweils 100 µl verdünnte Probe der zu testenden Patientenprobe pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 µl Waschlösung waschen.

Schritt 3: Konjugat-Inkubation:

100 µl verdünntes Protein-A/alkalische Phosphatase-Konjugat in jedes Well pipettieren (einschliesslich serumfreier Blankwert).

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Absaugen, und 4 x mit ~ 250 µl Waschlösung waschen.

Schritt 4: Substratinkubation:

100 µl Substrat in jedes Well pipettieren.

Die Wells mit einer Folie abdecken, und 30 Minuten bei 37°C inkubieren.

Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopp-Lösung in jedes Well beendet.

Schritt 5: Absorptionsmessung:

Plattenboden, falls notwendig, abwischen, Luftblasen entfernen und die Absorption bei $\lambda = 405$ nm innerhalb einer Stunde nach Hinzugabe der Stopp-Lösung messen.

Ergebnis-Auswertung:

Den Wert des Blanks (serumfreier Blank) von allen gemessenen Werten abziehen. Der Test ist valide, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- Absorption (A) der Positiv-Kontrolle > 1,200
- A der schwach positiven Kontrolle > 11% der A der positiven Kontrolle
- A der negativen Kontrolle < 8% der A der positiven Kontrolle
- A des serumfreien Blanks < 0,350

Qualitätskontrollen aktueller Testeinheiten sind auf unserer Internetseite zu finden: www.bordier.ch.

Die Antikörperkonzentration des schwach positiven Serums (Cut-off) 6100-07 ist so eingestellt, dass optimal zwischen Seren von Fällen mit Aspergillose in immunkompetenten Patienten und von gesunden Patienten unterschieden werden kann.

Die Cutoff-Index einer Probe ist definiert wie folgt.- Nach Subtraktion des serumfreien Blanks:

$$\text{Index} = \frac{\text{Absorption der Patienten Probe}}{\text{Absorption der Cut-off Probe}}$$

Das Ergebnis ist **negativ**, wenn der Index der analysierten Probe kleiner als **0,8** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Aspergillus fumigatus**-Antigen als nicht signifikant angesehen.

Die **Grauzone** umfasst einen Index zwischen **0,8** und **1,0**. In diesem Fall wird die Patientenprobe als grenzwertig eingestuft, diese Serumprobe sollte mit diesem Material wiederholt oder durch eine erneute Abnahme 2-4 Wochen später, nochmals gemessen werden.

Das Ergebnis ist **positiv**, wenn der Index der analysierten Probe größer als **1,0** ist. In diesem Fall wird die IgG-Antikörperkonzentration gegen das **Aspergillus fumigatus**-Antigen als signifikant angesehen. Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis auf eine Aspergillose oder eine Aspergillose-Sensibilisierung.

Bei positiven oder unklaren Ergebnissen empfehlen wir die Durchführung eines Bestätigungstests (meist durch Western Blot), sofern ein solcher Test verfügbar oder aufgrund nationaler Vorschriften erforderlich ist.

Analytische Leistungen:

Analytische Spezifität:

Eine Sensitivität von 22% wurde bei einer Gruppe von 9 Seren von 5 Patienten mit invasiver Aspergillose ermittelt. Bei immunsupprimierten Patienten wird beim Test zusätzlich der Nachweis von *A. fumigatus*-Antigenen im Serum empfohlen. Eine Spezifität von 97% wurde bei einer Gruppe von 36 Seren von 24 Patienten mit Atemwegserkrankungen, die nicht auf *Aspergillus* zurückgehen (Candidose, Tuberkulose, Pneumozystose und Kryptokokkose), ermittelt.

Es wurden keine positiven oder negativen Interferenzen mit supraphysiologischen Konzentrationen von Hämoglobin, Lipiden oder Bilirubin in Seren beobachtet, die mit Interferenzen ergänzt wurden.

Erläuterung:

Die Wiederholgenauigkeit des Tests wurde durch 24-fache Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in einem Testlauf bestätigt. Die Reproduzierbarkeit des Tests wurde durch Paralleluntersuchung von 2 Humanserumproben in 10 unabhängigen Testläufen bestätigt.

	Wiederholgenauigkeit		Reproduzierbarkeit	
	Proben 1	Proben 2	Proben 1	Proben 2
Durchschnitt (A Wert)	0,352	1,767	0,410	1,985
Standardabweichung (A Wert)	0,027	0,069	0,038	0,096
Variationskoeffizient (%)	7,6	3,9	9,3	4,8

Die folgenden Leistungen können nicht bewertet werden, da kein zertifiziertes Referenzmaterial für diese Analyse vorliegt:

Analytische Empfindlichkeit (Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen), Genauigkeit, Richtigkeit, Messbereich, Linearität.

Klinische Leistungen:

Diagnostische Sensitivität:

Eine Sensitivität von 97% wurde bei einer Gruppe von 230 Seren von 147 Patienten mit verschiedenen Aspergillosen (104 chronische pulmonale Aspergillosen - darunter 17 Aspergillome - und 43 allergische bronchopulmonale Aspergillosen) ermittelt.

Diagnostische Spezifität:

Eine Spezifität von 90% wurde bei einer Gruppe von 206 Seren von 205 Patienten mit Atemwegs-symptomen, bei denen eine Erkrankung infolge von *Aspergillus* ausgeschlossen werden konnte, ermittelt.

Positiver (PPV) und negativer Vorhersagewert (NPV):

Für die obengenannten Populationen wurde ein PPV von 92% und ein NPV von 96% ermittelt.

Erwartete Werte in normalen und betroffenen Populationen:

In einer Normalpopulation von 99 Schweizer Blutspendern, 98 Seren aus einer Schweizer Infektiologie-Abteilung und 90 Seren von Patienten mit Verdacht auf Aspergillose, bei denen diese Krankheit jedoch sicher ausgeschlossen werden konnte, beträgt der erwartete Indexwert 0,16. In einer betroffenen Population mit 63 Seren von Patienten, die an verschiedenen Formen der Aspergillose leiden, beträgt der erwartete Indexwert 2,16.

Zwischenfälle:

Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit dem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig ist, zu melden.

Grenzen:

Die Diagnosestellung sollte nicht anhand von Ergebnissen eines einzelnen Tests erfolgen. Die vollständige Diagnosestellung sollte unter Berücksichtigung der endemischen Situation, Krankengeschichte und Symptomatik sowie unter Verwendung von bildgebenden Verfahren sowie serologischen Daten stattfinden.

Bei Neugeborenen und immunsupprimierten Patienten haben die serologischen Daten eine beschränkte Aussagekraft.

Referenzen:

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, Switzerland.

Phone: + 41 21 633 31 67, Fax : + 41 21 633 31 78, www.bordier.ch

