

Aspergillus fumigatus IgG ELISA

Enzymimmunoanalyse for diagnose av human aspergillose af *Aspergillus fumigatus*

96 analyser på individuelle brønner for in vitro-diagnostisk bruk og for profesjonelt laboratoriebruk.



Bruksanvisning for artikkel N° 6100
UDI-DI: 07640158216101



Tiltenkt bruk:

Bordier *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA-settet er ment for kvalitativ påvisning av IgG-antistoffer mot *Aspergillus fumigatus* i menneskelig serum. Serologi er et hjelpemiddel for diagnose og kan ikke brukes som den eneste metoden for diagnose.

Bakgrunn:

Lungeaspergillose er forårsaket av forskjellige patogene arter av sopp-slekten *Aspergillus*, hvor *Aspergillus fumigatus* er mest vanlig. Denne patogenen finnes i jord og forfallende organisk materiale. Mennesker inhalerer hundrevis av sporer hver dag, men kun personer med risikofaktorer vil utvikle forskjellige typer aspergillose: allergisk bronkopulmonal aspergillose, allergisk sinusitt, aspergillom og kronisk pulmonal aspergillose. De viktigste symptomene er hoste og kortpustethet. Siden disse symptomene er uspesifikke, baseres diagnosen på en kombinasjon av kliniske, radiologiske, biologiske og mykologiske kriterier. Serologi er et viktig kriterium, og flere metoder er tilgjengelige for screening, oppfølging og bekreftelse.

Prinsipp og presentasjon:

Settet inkluderer alt materiale som behøves for å utføre 96 enzymkoblede immunoabsorbende analyser (ELISA) på nedbrytbare mikrotitreringsbrønner sensitisert med følgende blanding:

- Oppløselige somatiske og metabolske antigener fra *Aspergillus fumigatus*.
- Rekombinante antigener: dipeptidylpeptidase type V (kymotrypsin) og ribonuklease (mitogillin) fra *Aspergillus fumigatus*.

Spesifikke antistoffer i prøven vil binde seg til disse antigenene, og vasking vil fjerne uspesifikke antistoffer. Tilstedeværelsen av soppespesifikke antistoffer oppdages med et Protein A - alkalisk fosfatase-konjugat. Et andre vasketrinn vil fjerne ubundne konjugater. Avdekking av bundne antistoffer gjøres ved tilsetning av pNPP-substrat, som blir gult i nærvær av alkalisk fosfatase. Fargeintensitet er proporsjonal med mengden *Aspergillus fumigatus* spesifikke antistoffer i prøven. Kaliumfosfat tilsettes for å stoppe reaksjonen. Absorbansen ved 405 nm leses ved bruk av en ELISA mikroplateleser.

Testen er manuell, men kan utføres med automatiske systemer, som må valideres av brukeren.

Materiale som er inkludert i settet (96 analyser):

WELL	6100-01	Nedbrytbare ELISA-strips sensitisert med <i>Aspergillus fumigatus</i> antigens	96	brønner
DILB	6100-02	Fortynningsbuffer (10 x) konsentrat, farget lilla	50	ml
WASH	6100-03	Vaskeløsning (10 x) konsentrat	50	ml
ENZB	6100-04	Enzymbuffer	50	ml
STOP	6100-05	Stoppende løsning (0.5M K ₃ PO ₄)	25	ml
CONTROL -	6100-06	Negativt kontrollserum (20 x), grønn hette	200	µl
CONTROL -/+	6100-07	Svak positivt kontrollserum (grense, 20 x), gul hette	200	µl
CONTROL +	6100-08	Positivt kontrollserum (20 x), rød hette	200	µl
CONJ	6100-09	Protein A – alkalisk fosfatase-konjugat (50 x), lilla hette	300	µl
SUBS	6100-10	Fosfatase-substrat (para-nitrofenylfosfat)	20	tabletter
		Multipipette-beholder, 25 ml	1	stykk
		Ramme for ELISA 8-brønn-holder	1	stykk

Holdbarhet og lagring:

Oppbevar settet mellom +2°C og +8°C (transport validert mellom -20°C og +37°C i 21 dager), unngå langvarig eksponering av komponentene for direkte lys. Utløpsdatoen og partinummeret for settet er trykt på siden av boksen. Etter første åpning er alle reagenser stabile til utløpsdatoen når de oppbevares mellom +2°C og +8°C.

Utstyr som behøves, men som ikke følger med settet:

Pipetter (ml og µl). Kolber. Fortynningsrør. Tape for å dekke brønnene under inkubasjoner. Destillert vann. Inkubator satt til +37°C. ELISA-leser satt til 405 nm. Manuelt eller automatisk utstyr for å skylle brønnene. Virvelmikser. Tidtaker.

Forberedelse av reagenser før bruk:

La alle reagenser ligge mellom +20°C og +30°C i minst 1 time og bland før bruk.

ELISA-brønner: åpne siden av aluminiumsposen 6100-01 og fjern antall brønner som behøves (én for blank, tre for kontroller samt antall prøver). Plasser sensiterte brønner i 8-brønn-holder(e). Om nødvendig, fyll de tomme posisjonene i holderen med brukte brønner. Sett holder(e) inn i rammen plassert korrekt. Forsegl den åpne pakken med tørkemiddelpute.

Fortynningsbuffer: fortynn fortynningsbuffer (10 x) konsentrat 6100-02, 1/10 i destillert vann. Dette brukes til fortynning av kontroller, prøver og konjugat. Den fortynnete bufferen er stabil i 2 måneder mellom +2°C og +8°C.

Vaskeløsning: fortynn vaskeløsning (10 x) konsentrat 6100-03, 1/10 i destillert vann. Du kan også bruke din egen vaskeløsning. Unngå buffere som inneholder fosfat, da dette kan hemme den enzymatiske aktiviteten til alkalisk fosfatase. Den fortynnete vaskeløsningen er stabil i 2 måneder mellom +2°C og +8°C.

Kontrollserum: fortynn 10 µl kontrollserum 6100-06 til -08 i 190 µl fortynningsbufferløsning (sluttfortynning 1/20). Det fortynnete kontrollserumet er stabilt i 2 måneder mellom +2°C og +8°C.

Konjugat: fortynn konjugat 6100-09 i fortynningsbufferløsning (sluttfortynning 1/50). Fortynn konjugat på dagen for analysen. Ikke lagre fortynnet konjugat.

Substratløsning: løs opp tablett(er) av fosfatase-substrat 6100-10 i ufortynnet enzymbuffer 6100-04 (1 tablett i 2,5 ml buffer). Virvle til tablett(en) er fullstendig oppløst(e). Fortynn substratet på dagen for analysen og holdt røret unna direkte lys. Tabletter og substratløsninger skal være fargeløse eller kun ha en svak gul nyanse. Hvis en tablett eller en substratløsning blir gul, kan den ha vært delvis hydrolysert og bør kastes. Ikke oppbevar substratløsningen.

Stoppende løsning: bruk reagens 6100-05 ufortynnet.

Prøvetaking og forberedelse:

Bruk humant serum. Oppbevar mellom +2°C og +8°C hvis analysert innen 7 dager, ellers oppbevar ved -20°C eller lavere. Unngå gjentatt frysing og tining. Virvle prøvene og fortynn 1/201 i fortynningsbufferløsning (for eksempel 5 µl prøve i 1,0 ml). Ikke oppbevar fortynnet prøve.

Advarsler og forhåndsregler:

Toksiske forbindelser finnes i følgende konsentrasjon:

Komponent	Referanse	Natriumazid (NaN ₃)	Merthiolate
Fortynningsbuffer (10 x)	6100-02	0,1 %	0,02 %
Vaskeløsning (10 x)	6100-03	0,05 %	/
Enzymbuffer	6100-04	0,01 %	/
Kontrollserum (20 x)	6100-06 til -08	0,1 %	0,02 %
Konjugat (50 x)	6100-09	0,1 %	/

Ved de brukte konsentrasjonene har natriumazid og merthiolate ingen toksikologisk risiko ved kontakt med hud og slimhinner.

Komponent	Farlig komponent	Farepiktogram	Fareerklæring	Forholdsreglererklæring
Stoppende løsning	Kaliumfosfat, tribasisk		Forårsaker alvorlig øyeskade	Bruk øyevern. VED ØYEKONTAKT: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Ta ut kontaktlinser, om tilstede og enkelt å gjøre. Fortsett å skylle.

- Det negative, grense- og positive kontrollserumet (6100-06 til -08) er av animalsk opprinnelse (kaniner) og må håndteres med forsiktighet.
- Behandle alle reagenser og prøver som potensielt smittsomme materialer.
- Ikke bytt reagenser mellom forskjellige partier eller Bordier ELISA-sett.
- Ikke bruk reagenser fra andre produsenter med reagenser fra dette settet.
- Ikke bruk reagenser etter utløpsdatoen deres.
- Lukk reagensflaskene tett umiddelbart etter bruk, og bytt ikke skrukorkene for å unngå kontaminering.
- Bruk separate og rene pipettespisser for hver prøve.
- Ikke gjenbruk mikrobrønner.
- Unngå forringelse av mikrobrønnene ved mekanisk håndtering (spisser/kjegler, dyser).
- Beskrivelsene av symbolene som brukes på etikettene finnes på nettstedet www.bordier.ch

Avfallshåndtering:

Alt materiale som brukes til denne testen betraktes generelt som farlig avfall. Henvist til nasjonale og regionale lover og forskrifter for avhending av farlig avfall.

Prosedyre:

Når du kjører analysen, unngå dannelsen av bobler i brønnene.

Trinn 1: Preinkubasjon:

Fyll brønnene med 250 µl fortynningsbufferløsning.

Inkuber i 5 til 15 minutter mellom +20°C og +30°C.

Fjern fortynningsbufferen ved aspirasjon eller ved å riste brønnene over vasken.

Trinn 2: Inkubasjon med prøver:

Fyll den første brønnen i den første stripen med 100 µl fortynningsbuffer (ikke-serum blank).

Fyll de påfølgende tre brønnene med henholdsvis 100 µl fortynnet negativt, svak positivt (grense) og positivt kontrollserum. For analyser med over 25 prøver anbefaler vi å fylle de tre siste brønnene med kontrollserum som et duplikat.

Fyll de resterende brønnene med de fortynnede prøvene (100 µl hver).

Dekk brønnene med tape og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Fjern serumene og vask 4 ganger med ~ 250 µl vaskeløsning.

Trinn 3: Inkubasjon med konjugat:

Distribuer 100 µl fortynnet konjugat i hver brønn (inkludert ingen-serum blank).

Dekk brønnene med tape og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Fjern konjugatet og vask 4 ganger med ~ 250 µl vaskeløsning.

Trinn 4: Inkubasjon med substrat:

Distribuer 100 µl substratløsning per brønn.

Dekk brønnene med tape og inkuber i 30 minutter ved +37°C.

Stopp reaksjonen ved å tilsette 100 µl stoppende løsning i hver brønn.

Trinn 5: Måling av absorbanser:

Dersom nødvendig, tørk bunnen av brønnene og fjern bobler. Mål absorbansene ved 405 nm innen 1 time etter tilsetning av stoppende løsning.

Tolkning:

Trekk verdien av ingen-serum blank fra alle målte verdier. Når det er aktuelt, beregn gjennomsnittlige absorbansverdier for dupliserte serumkontroller. Testen er gyldig hvis følgende kriterier er oppfylt:

- Absorbans (A) av positiv kontroll > 1.200
- A av svak positiv kontroll > 11 % av A av positiv kontroll
- A av negativ kontroll < 8 % av A av positiv kontroll
- A av ingen-serum blank < 0.350

Dersom prøven gir signal som overskrider mikroplateleserens måleområde, bør verdien som tilsvarer leserens øvre måleområde tilskrives.

Kvalitetskontroller for gjeldende partier publiseres på nettsiden vår: www.bordier.ch

Antistoffkonsentrasjonen av svak positivt (grense) serum 6100-07 er satt for å diskriminere optimalt mellom serum fra klinisk dokumenterte tilfeller av aspergillose hos immunkompetente pasienter og friskt humant serum. Grenseindeksen til en prøve defineres, etter subtrahering av ikke-serum blank, som:

$$\text{Indeks} = \frac{\text{Absorbansprøve}}{\text{Absorbansgrense serum}}$$

Resultatet er **negativt** når indeksen til den analyserte prøven er lavere enn 0,8. I dette tilfellet er IgG antistoffkonsentrasjonen mot *Aspergillus fumigatus*-antigener klinisk ikke-signifikant.

Et gråt område svarer til et indeks mellom 0,8 og 1,0. I dette tilfellet betraktes prøven som grænsetilfælde, og det anbefales at gentage testen med den samme prøve eller med et nytt serum fra den samme pasient, taget etter 2-4 uger.

Resultatet er **positivt** når indeksen til den analyserte prøven er høyere enn 1,0. I dette tilfellet anses IgG antistoffkonsentrasjonen mot *Aspergillus fumigatus*-antigener som klinisk signifikant. Det indikerer at pasienten har hatt kontakt med parasitten.

I tilfelle av positivt eller tvilsomt resultat anbefaler vi å utføre en bekreftelsestest (oftest ved western-blot) hvis en slik test er tilgjengelig eller kreves av nasjonale forskrifter.

Analytiske ytelser:

Analytisk spesifisitet:

En spesifisitet på 97 % ble funnet med 36 serum fra 24 pasienter som lider av ikke-aspergillus respiratoriske sykdommer (candidiasis, tuberkulose, pneumocystose og cryptococcosis).

Ingen positiv eller negativ interferens ble observert med supraphysiologiske konsentrasjoner av hemoglobin, lipider eller bilirubin i serum som var supplert med interferenter.

Presisjon:

Repetisjonsnøyaktighet ble vurdert ved å teste 2 humane serumprøver i 24 brønner på 1 test.

Reproduserbarhet ble vurdert ved å teste de 2 humane serumprøvene i duplikat på 10 forskjellige analyser.

	Repetisjonsnøyaktighet		Reproduserbarhet	
	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
Gjennomsnitt (absorbans)	0,352	1,767	0,410	1,985
Standardavvik (absorbans)	0,027	0,069	0,038	0,102
Variasjonskoeffisient (%)	7,6	3,9	9,2	5,1

Kliniske ytelser:

Diagnostisk sensitivitet:

En sensitivitet på 97 % ble funnet med 230 serum fra 147 pasienter som lider av forskjellige aspergillose (104 kronisk pulmonal aspergillose (inkludert 17 aspergillomer) og 43 allergisk bronkopulmonal aspergillose).

Diagnostisk spesifisitet:

En spesifisitet på 90 % ble funnet med 206 serum fra 205 pasienter med respiratoriske symptomer der en Aspergillus-relatert sykdom hadde blitt utelukket.

Positiv og negativ prediktiv verdi:

En PPV på 92 % og en NPV på 96 % ble funnet hos de nevnte populasjonene ovenfor.

Forventede verdier i normale og rammede populasjoner:

I en normal populasjon av 99 sveitsiske blodgivere, 98 serum fra en sveitsisk infeksjonsenhet og 90 serum fra pasienter mistenkt for aspergillose, men hvor denne sykdommen definitivt ble utelukket, er den forventede indeksverdien 0,16. I en rammet populasjon med 63 serum fra pasienter som lider av forskjellige aspergillose, er den forventede indeksverdien 2,16.

Hendelser:

Enhver alvorlig hendelse som oppstår i forbindelse med enheten skal meldes til produsenten og til den kompetente myndigheten i medlemsstaten der brukeren og/eller pasienten er etablert.

Begrensninger:

En sensitivitet på 22 % ble funnet med 9 serum fra 5 pasienter som lider av invasiv aspergillose. Hos immunsupprimerte pasienter anbefales det å fullføre testen med påvisning av *A. fumigatus*-antigener i serum.

Diagnosen av en smittsom sykdom bør ikke fastsettes utelukkende på grunnlag av et enkelt testresultat. En presis diagnose bør ta hensyn til endemiske situasjoner, klinisk historikk, symptomatologi, avbildning samt serologiske data.

Hos immunkompromitterte pasienter og nyfødte er serologiske data av begrenset verdi.

Referanser:

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.

Yamagishi, I., Bamba, Y., Moro, H., Kanno, N., Tsuruma, H. Hakamata, M. et al. (2024) Retrospective Comparison of Two Aspergillus IgG Enzyme Immunoassays for Diagnosing Pulmonary Aspergillosis. Med. Mycol. J. 65 : 41-47.



BORDIER AFFINITY PRODUCTS S.A.
Rue de Morges 22, 1023 Crissier, Switzerland.
+41 21 566 17 18 cb@bordier.ch www.bordier.ch

