

Standaardisatie kinkhoestserologie

We weten hoe het moet

Nu nog doen

Indeling praatje

- State of the art
 - Welke antigenen en welke isotypen zijn geschikt voor diagnostiek?
 - Wat weten we over de antistofrespons?
 - Hoe baseren we daar diagnostiek op?
- Standaardisatie
 - Praktische toepassing in commerciële EIA's

Antigenen

- Mogelijkheden zijn
 - Pertussis-toxine (PT): gevoelig en specifiek
 - Filamenteus haemagglutinine (FHA): minder specifiek
 - Whole cell: nog minder specifiek
- Toevoeging van andere antigenen naast PT levert verlies aan diagnostische prestaties

Isotypen

- Onderzocht zijn IgG, IgA en IgM
- IgG onderscheidt goed tussen kinkhoest en geen kinkhoest
- Naast IgG heeft toevoeging van IgA of IgM geen meerwaarde

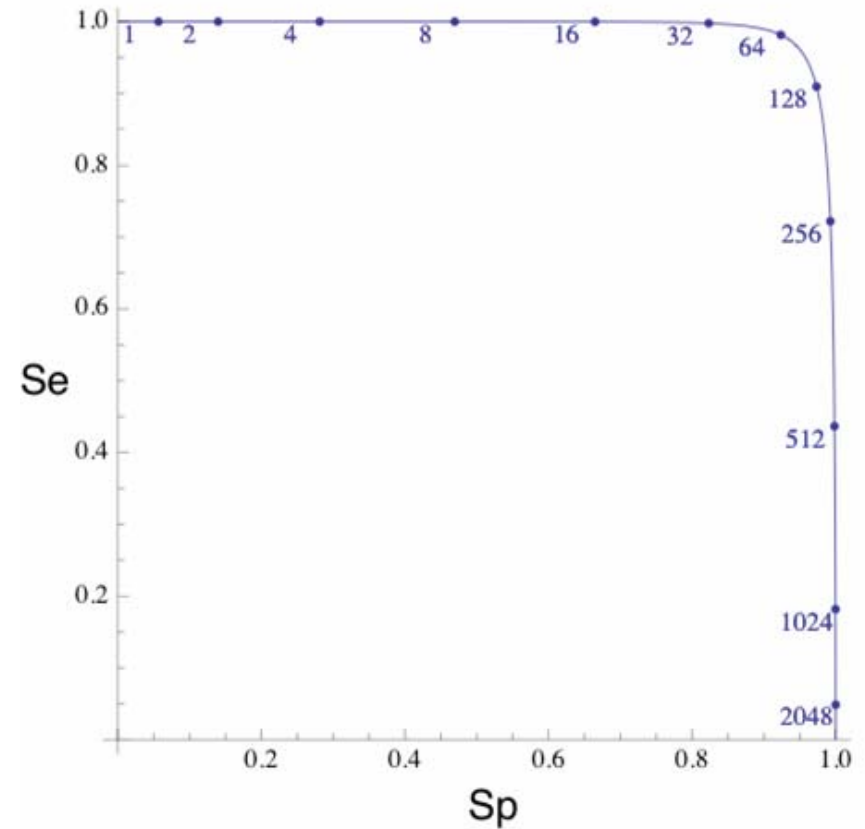
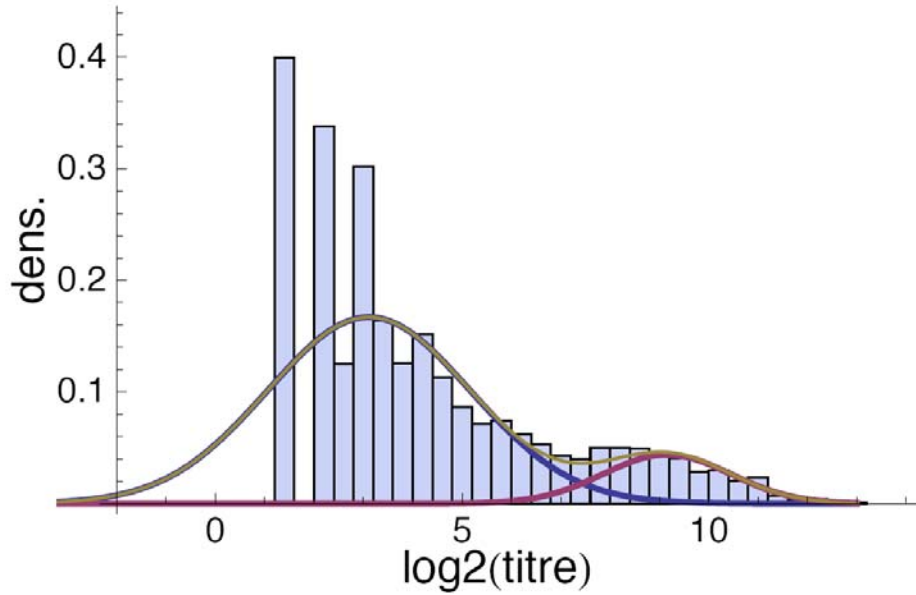
IgG tegen PT

- We houden een test over: IgG tegen PT.
- De IgG PT spiegel kan worden uitgedrukt in Internationale Eenheden
- Betekenis van zulke uitslagen is goed beschreven

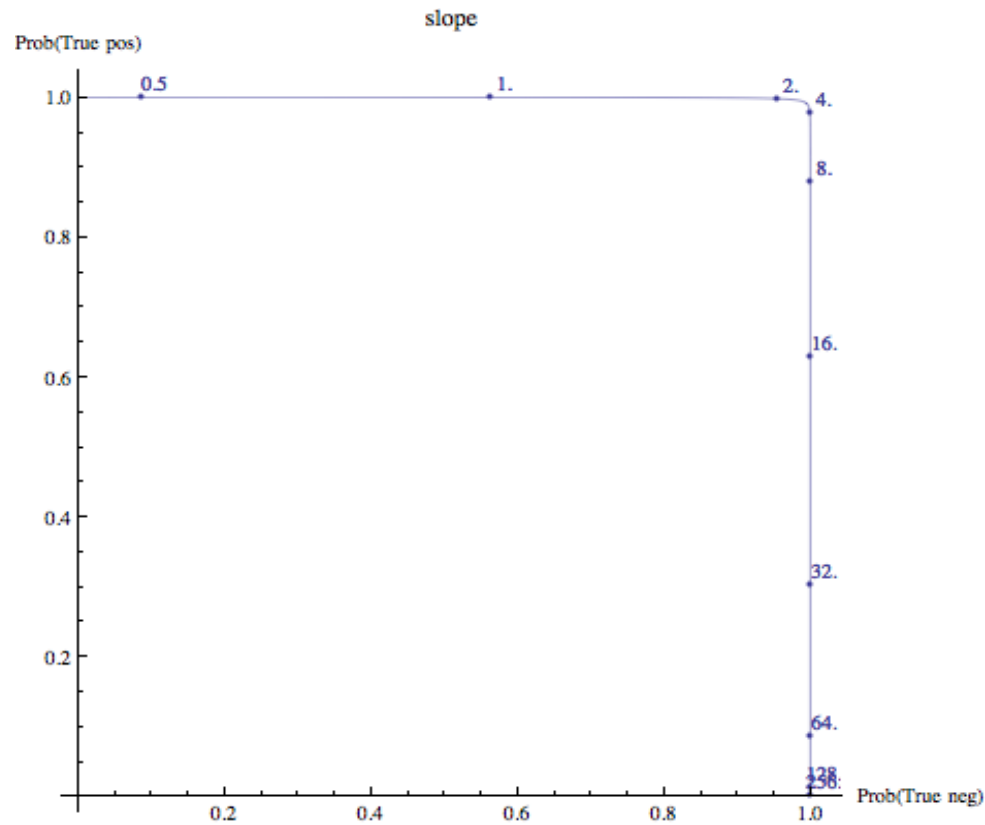
IgG PT uitgedrukt in IE/ml

- Lineaire schaal: 1:2 verdunning van 200 IE/ml levert 100 IE/ml, etc.
- Titerstijgingen zijn goed te definiëren
- Grenswaarde voor eenpuntsserologie is 100 of 125 IE/ml (PIENTER studie)

Two component cluster analysis IgG-PT in 'single sera'



ROC curve dynamiek kinderen 0-9 jaar (Peter Teunis et al)



IgG PT uitgedrukt in IE/ml

- Een viervoudige titerstijging is diagnostisch (clusteranalyse op sera van in de tijd vervolgde patiënten)
- Eenvoudig diagnostisch algoritme:
 - Een serum boven de eenpunts-cut-off
 - Of een viervoudige stijging in een serumpaars, met het tweede serum >25 IE/ml
 - leveren een sensitief en specifiek diagnosticum op.
- Voorwaarde: een IgGPT assay met een uitslag in IE/ml!

Praktische uitvoering

- Wat is er aan assays beschikbaar?
- Assays uit de research
 - RIVM heeft er diverse, allemaal in IE/ml behalve de routine assay. 100 RIVM/LIS E ~ 125 IE.
- Commerciële assays
 - Uitslag in IE/ml: is die nauwkeurig genoeg?
 - Uitslag in andere eenheden: kunnen we die omrekenen?

Experiment: sera

- 40 sera, verdeeld over het meetgebied van de Virotech EIA
- Een mengserum, gebruikt als standaardserum

Experiment: EIA's

- virion\serion IgG PT(Leverancier: Clindia)
- Virotech IgG PT (ITK)
- FDA referentie-EIA (RIVM-LIS, Guy Berbers)

Experiment: uitvoering

- EIA van RIVM op standaardserum
- EIA van RIVM op de 40 sera
- Dat is de referentie

- EIA's van Virotech en virion\serion
 - Volgens fabrikant, met extra's
 - een 8-staps verdunningsrij van de standaard
 - 3-staps verdunningen van de onbekenden
 - Eerste verdunning 1:100

Berekeningen

- Virotech geeft een genormeerde OD:

$$y_n = 10 \frac{y - y_b}{y_c - y_b}.$$

- y : OD onbekende;
- y_b : OD blanco
- y_c : OD cutoff controle;
- y_n : genormeerde OD

Berekeningen

- virion\serion normeert de OD ook, maar anders:

$$y_n = \frac{y \cdot y_{ref}}{y_p}$$

- met y_p : de gemeten OD van een pos. controle
- en y_{ref} : de nominale OD van die controle
- Geen blanco.

Berekeningen

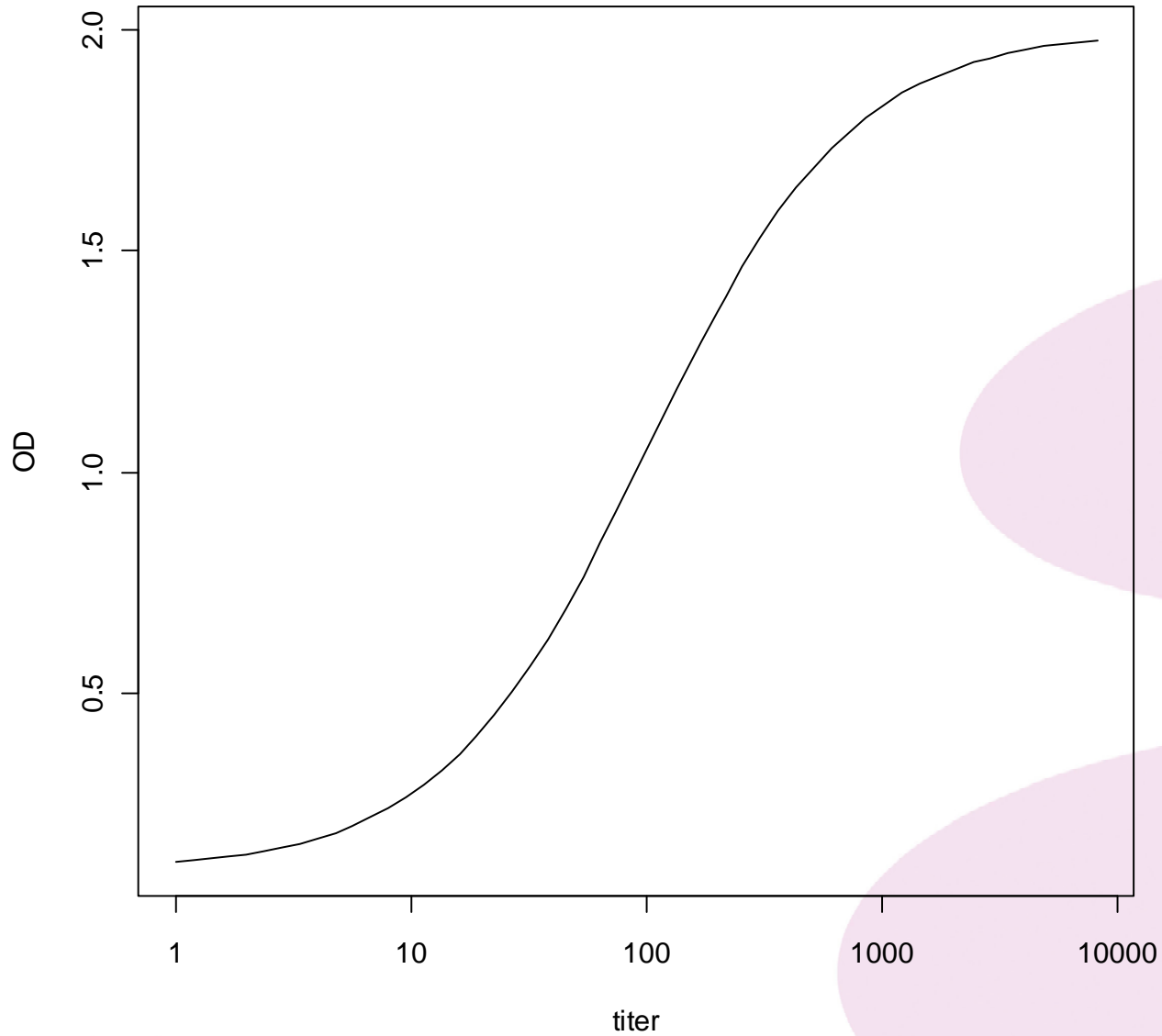
- Die y_n kun je omrekenen tot “titer”, x , met:

$$y_n = f(x; \mathcal{G}) = d + \frac{a - d}{1 + \exp(b(c - \ln x))};$$

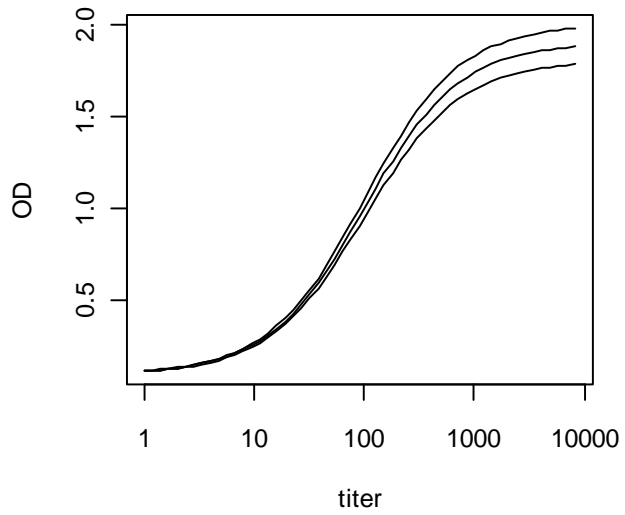
$$x = f^{-1}(y_n; \mathcal{G}) = \exp\left(c + \frac{1}{b} \ln\left(\frac{y_n - d}{a - y_n}\right)\right).$$

- virion\serion geeft waarden voor a , b , c , d ;
Virotech niet.

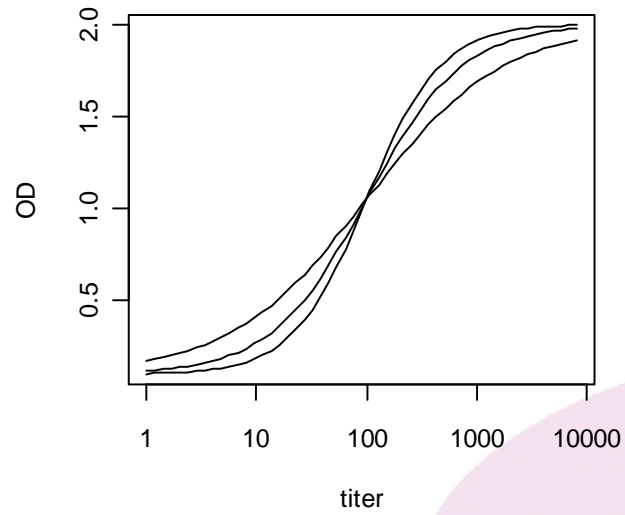
OD vs titer



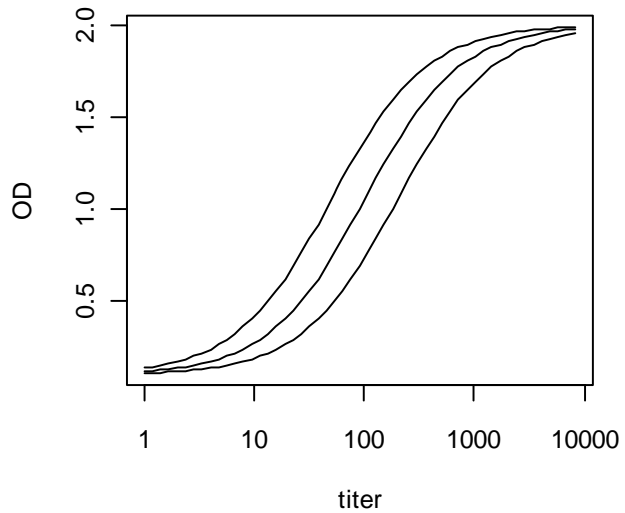
a: OD in verzadiging



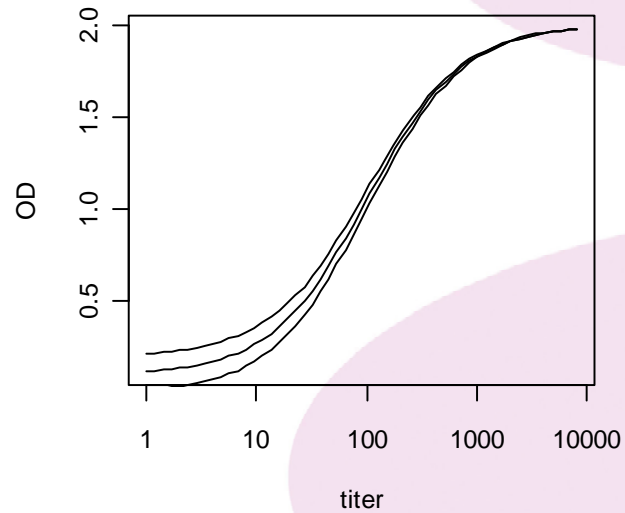
b: helling



c: plaats curve



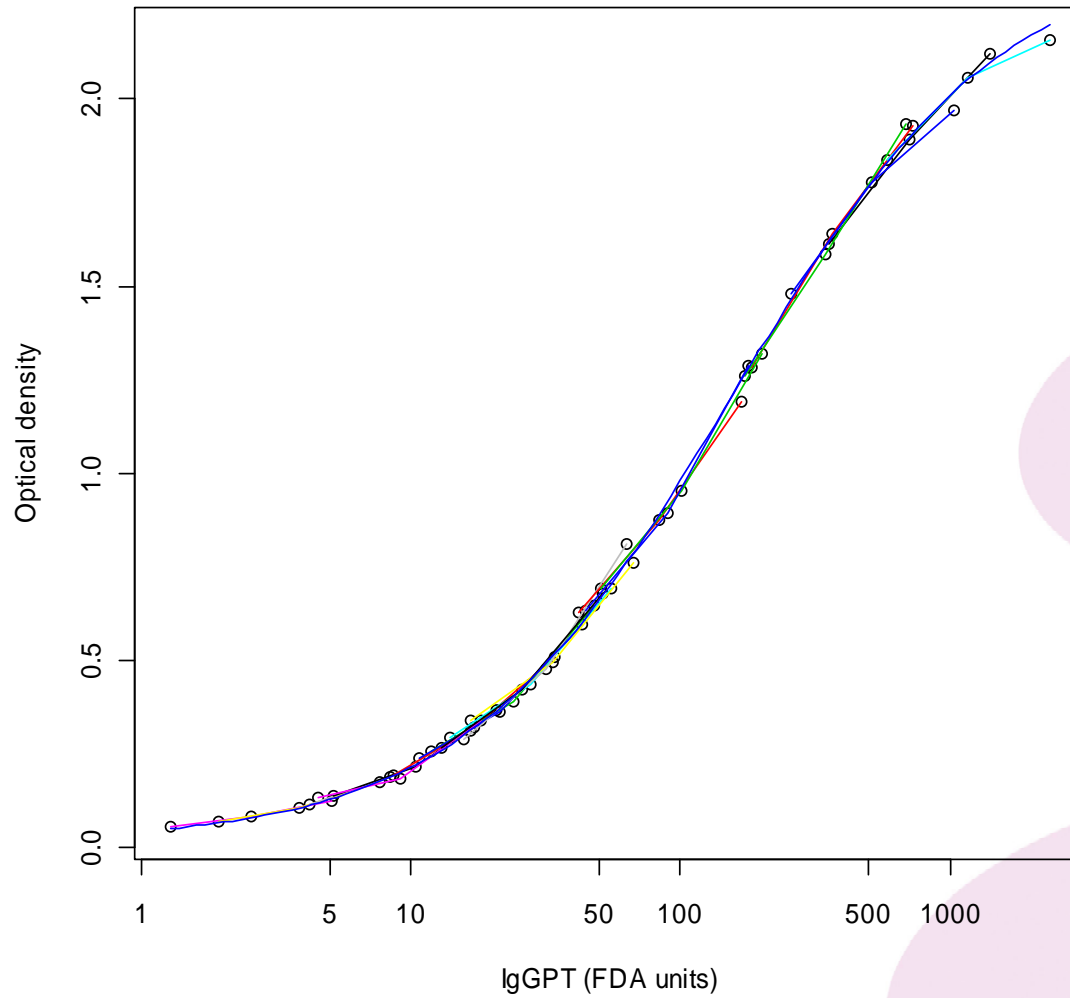
d: achtergrond



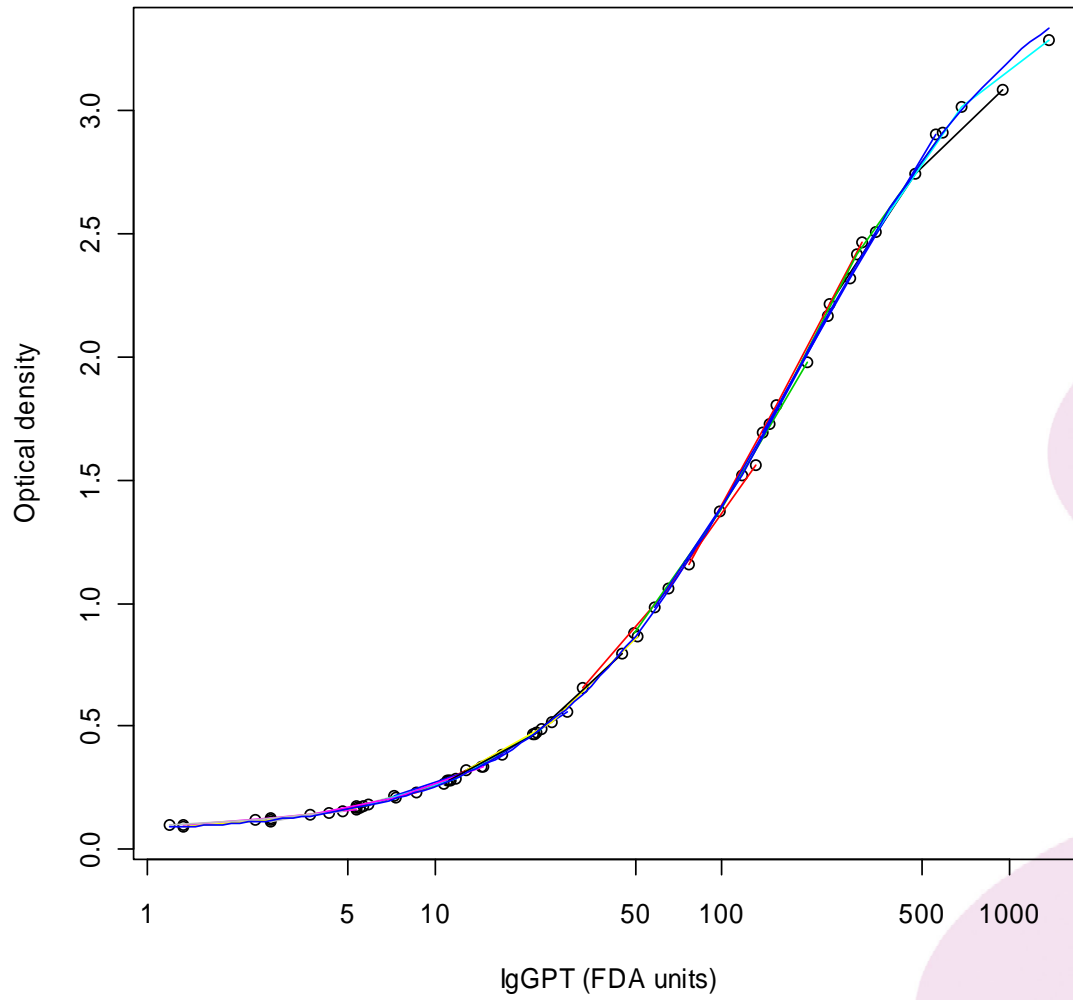
Berekeningen

- De parameters a , b , c , d en de titers van de onbekenden werden aangepast met de kleinste-kwadratenmethode

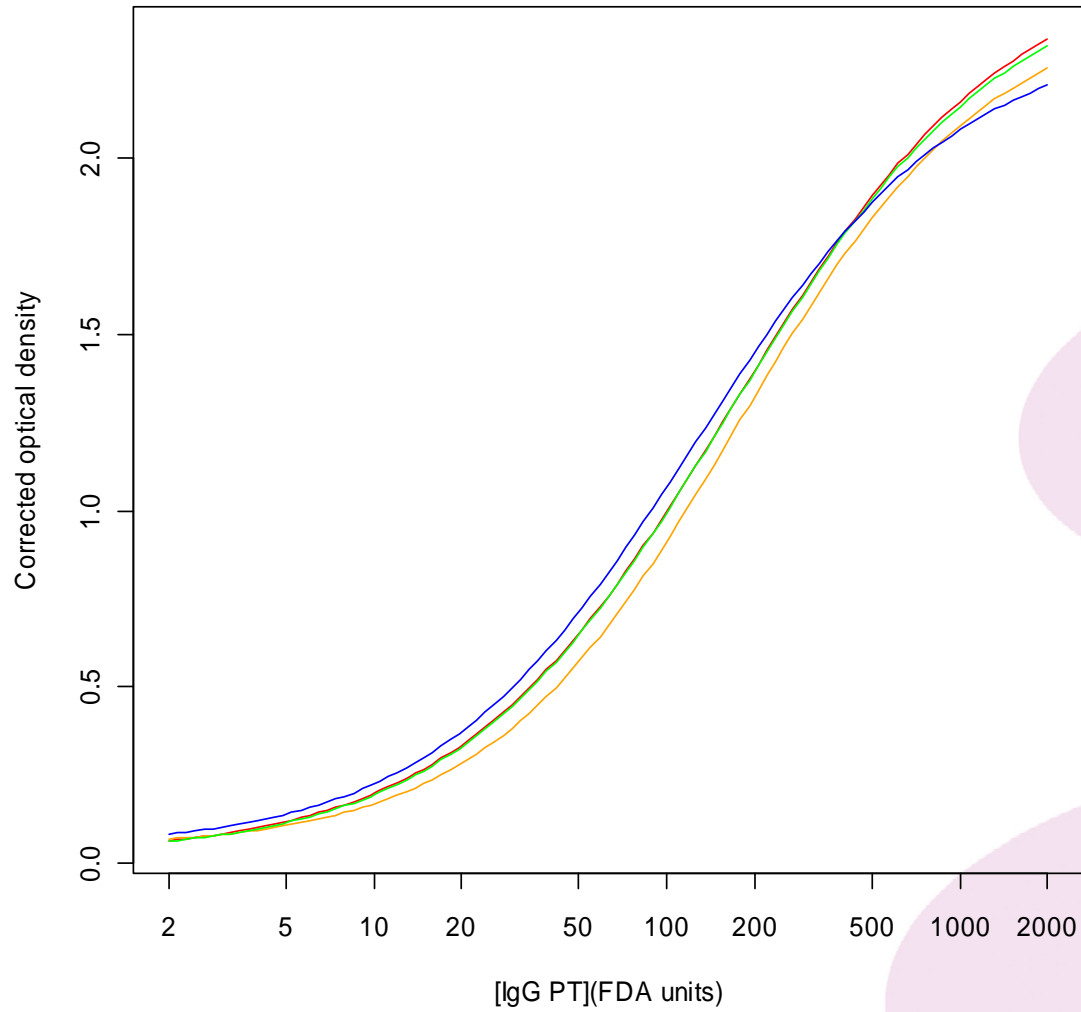
Virotech plate 2: sera 21-40



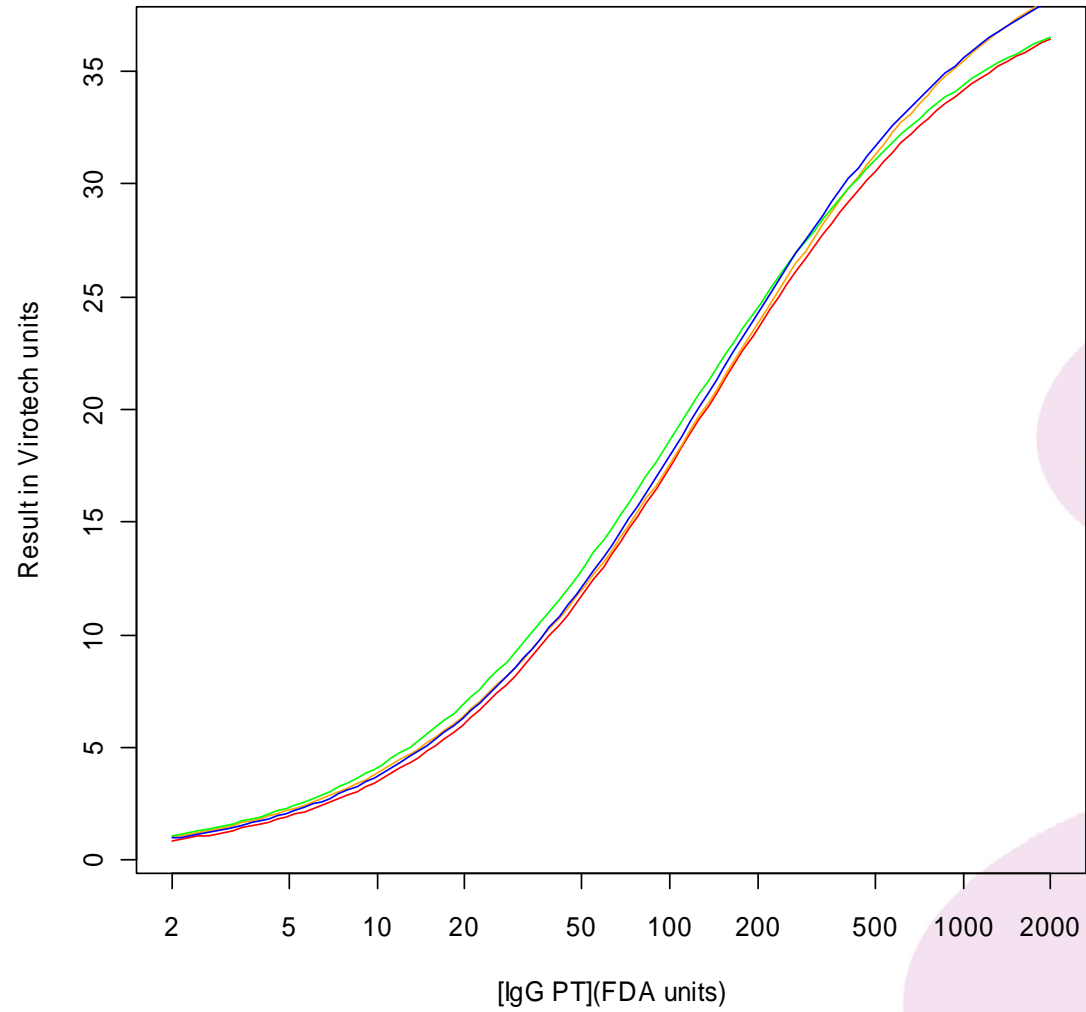
Virion/Serion plate 2: sera 21-40



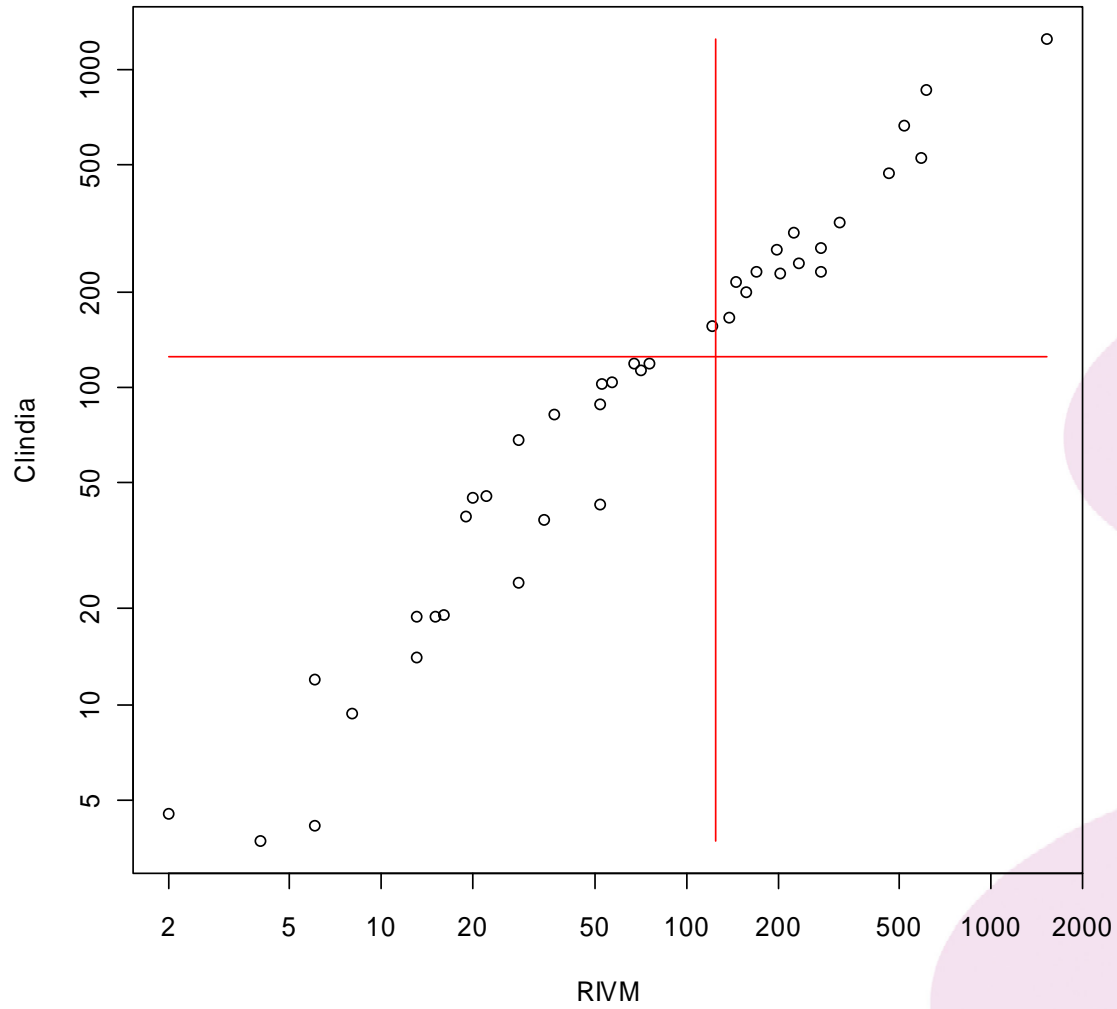
Calibration curves for Clindia



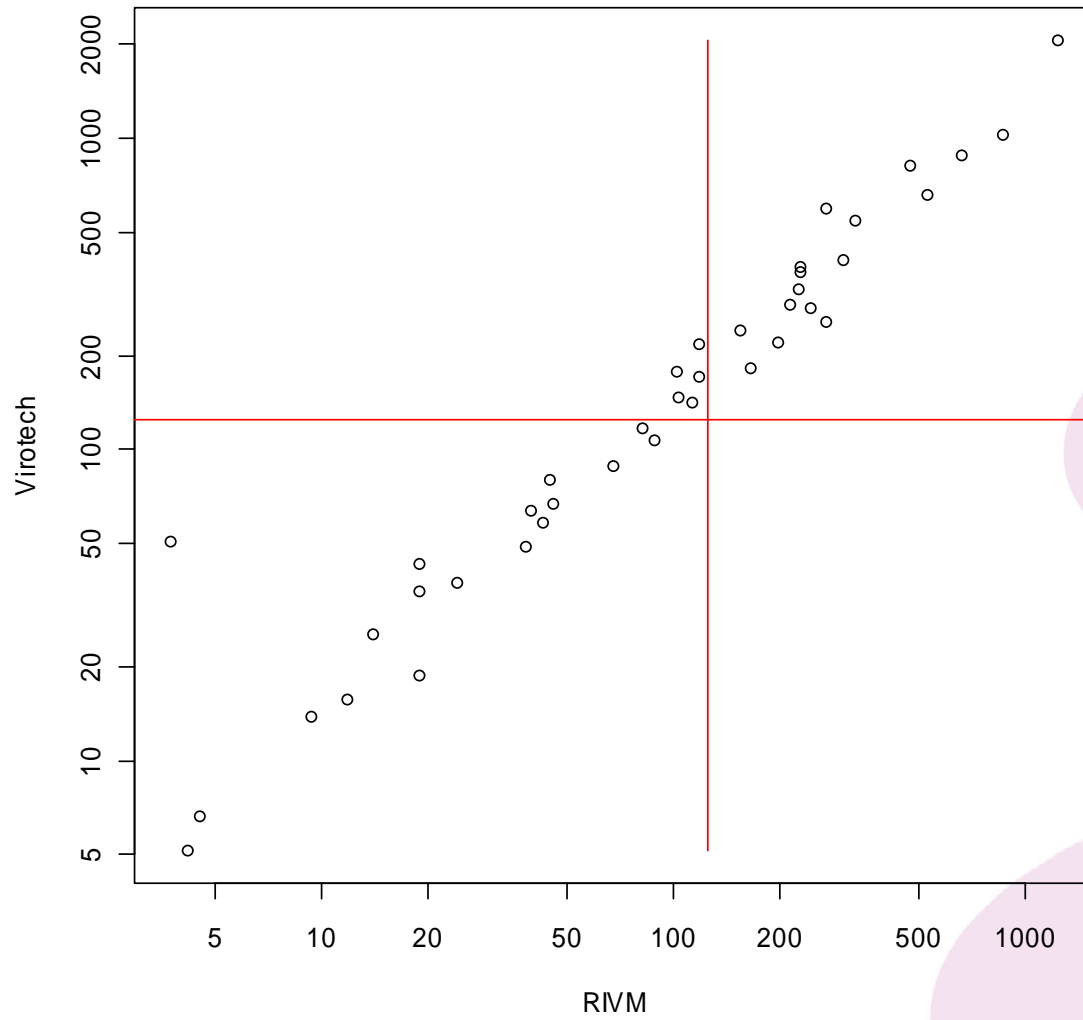
Calibration curves for Virotech



IgG PT in FDA units: Clindia vs RIVM



IgG PT in FDA units: Virotech vs RIVM



Een uitbijter

- <5 in virion\serion, rond 50 in Virotech
- Hoe kan dat?
- PT is heel duur en moeilijk te zuiveren
- We vermoeden dat de zuiverheid van het antigeen er iets mee te maken heeft

Parameters Virotech

• Run	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>
<i>y125</i>			
• 1	39.405	0.911	4.856
19.5			
• 2	42.488	0.852	5.010
19.6			
• 3	39.359	0.886	4.726
18.9			
• 4	41.660	0.886	4.918

Conclusies parameters Virotech

- In dit experiment behoorlijk stabiel
- Voor titerstijgingen goed genoeg
- Er wordt een cut-off controle gebruikt, met een te lage cut-off
- Daarom is de stabiliteit rond de juiste cut-off niet gegarandeerd
- Samen met een home made cut-off controle is de test bruikbaar

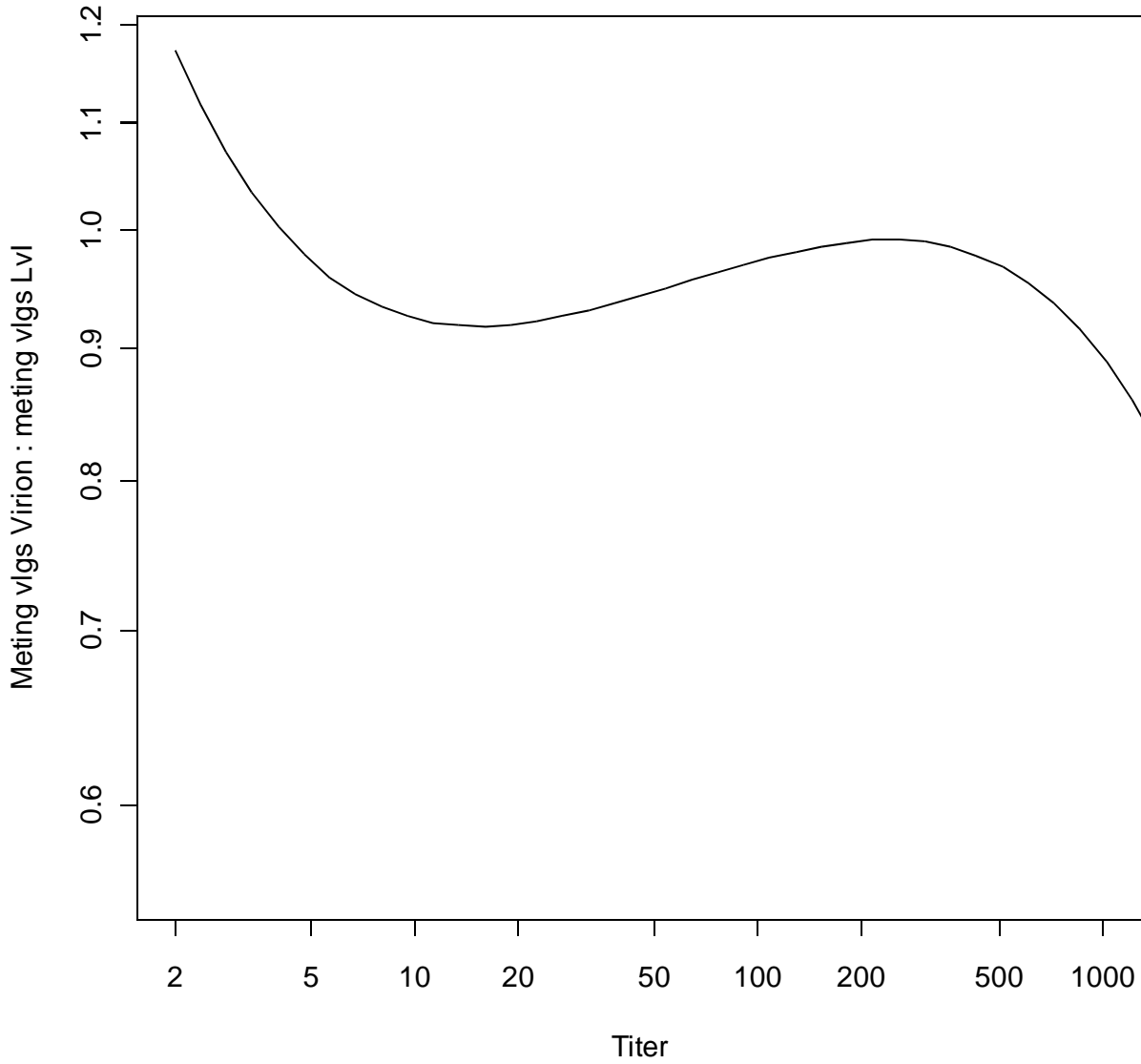
Parameters virion\serion

- Run *a* *b* *c* *d*
y125
- 1 2.574 0.923 5.123 0.023
1.126
- 2 2.444 1.016 5.158 0.044
1.045
- 3 2.539 0.935 5.097 0.022
1.123
- 4 2.356 0.968 4.838 0.042

virion\serion: gevonden ijklijn vs officiële ijklijn

- De parameters zijn significant verschillend
- Wat betekent dat in de praktijk?

Effect van ijklijn op meting



Conclusies virion\serion

- De gevonden afwijkingen zijn in de praktijk verwaarloosbaar
- De test is bruikbaar zowel voor dynamiek als voor eenpuntsserologie

Conclusies

- Serodiagnostiek van kinkhoest moet met IgG PT
- IgG PT titers moeten in IE/ml worden uitgedrukt
- Met commerciële EIA's is dat mogelijk
- EIA's waarvan de fabrikant een uitslag in IE/ml ondersteunt verdienen de voorkeur
- Met andere EIA's kan het ook, maar daar komt veel onderhoud aan te pas.
- Een precisie van 10% is meer dan voldoende