

clarus
ASPERGILLUS GM
ENZ YME IMMUNOASSAY

For the Qualitative Detection of *Aspergillus* Galactomannan – REF AGM101

R_x ONLY

IVD For In Vitro
Use Only

2°C  8°C



USO PREVISTO

El EIA de galactomanano de *Aspergillus* (EIA de AGM) clarus es un ensayo inmunoenzimático en microplaca tipo sándwich no automatizado que se utiliza para la detección cualitativa de galactomanano de *Aspergillus* en suero y muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con riesgo de aspergilosis invasiva.

Si se combina con otros procedimientos de diagnóstico como el cultivo microbiológico, el examen histológico de muestras de biopsia y la evidencia radiográfica, el EIA de AGM clarus puede utilizarse como ayuda en el diagnóstico de la aspergilosis. Está diseñado para uso profesional de laboratorio.

RESUMEN Y DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

El género *Aspergillus* spp. está formado por hongos filamentosos ubicuos que se encuentran en todo el mundo y pueden vivir tanto en interiores como en exteriores. La aspergilosis invasiva (AI) es causada por la inhalación de estas esporas de hongos. La AI es una de las amenazas más importantes para los receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas y de órganos sólidos. Las personas con sistemas inmunitarios debilitados debido a enfermedades como la infección por VIH/SIDA también corren un alto riesgo¹⁻³. Los factores de riesgo no tradicionales que se han identificado más recientemente para la AI incluyen estancias en la UCI e infecciones virales respiratorias⁴. En las últimas dos décadas ha habido un aumento significativo en la incidencia de AI debido al uso generalizado de tratamientos para algunas de estas afecciones, como la quimioterapia y los agentes inmunosupresores⁵⁻⁶. Se ha informado que las infecciones por *Aspergillus* representan hasta el 41 % de las infecciones en todos los pacientes trasplantados y tienen una asombrosa tasa de mortalidad de hasta el 92 % en esta población². La AI es difícil de diagnosticar, por lo que requiere un abordaje multidimensional que incluya características del paciente, hallazgos clínicos y radiológicos y evidencia micológica⁷⁻⁹. La detección y el tratamiento precoz de la infección son claves para reducir la mortalidad asociada a esta enfermedad¹⁰⁻¹¹.

El EIA de AGM clarus es un ensayo inmunoenzimático en microplaca sándwich no automatizado que detecta galactomanano de *Aspergillus* en muestras de suero y LBA. Si se combina con otros procedimientos de diagnóstico como el cultivo microbiológico, el examen histológico de muestras de biopsia y la evidencia radiográfica, el ensayo EIA de AGM clarus puede utilizarse como ayuda en el diagnóstico de la aspergilosis.

PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

El EIA de AGM clarus es un ensayo inmunoenzimático en microplaca sándwich no automatizado que detecta galactomanano de *Aspergillus* en muestras de suero y LBA. Las muestras de controles, suero y LBA requieren un pretratamiento térmico antes del ensayo. Después del pretratamiento, el sobrenadante de la muestra y los controles se pipetea en micropocillos tapizados con anticuerpos anti-*Aspergillus*. Los micropocillos se incuban a 37 °C y luego se lavan antes de agregar el conjugado. Después de una segunda incubación (37 °C) y lavado, se añade 3,3',5,5"-tetrametilbencidina (TMB). Los micropocillos se someten a una incubación final (37 °C) y luego se agrega solución de parada. El EIA de AGM clarus puede realizarse en menos de 3 horas y permite leer los resultados dentro de los 15 minutos posteriores a la finalización de la prueba.

Los anticuerpos monoclonales IgG anti-*Aspergillus* se unen a placas de micropocillos y se utilizan como anticuerpos de captura. Como reactivos de detección se utiliza un conjugado de peroxidasa de rábano picante (PHR) con anticuerpos monoclonales IgG anti-*Aspergillus*. El galactomanano es un polisacárido que se encuentra en la pared celular. Si la muestra del paciente contiene galactomanano de *Aspergillus*, esos antígenos se unirán a los anticuerpos de captura en los micropocillos. Antes de agregar el conjugado, se lavan los micropocillos, lo que elimina cualquier antígeno no unido del pocillo. Esto reduce el riesgo de resultados falsos negativos debido al efecto gancho de dosis altas. Una vez que se agrega el conjugado, el complejo antígeno-anticuerpo de captura se une a los anticuerpos de detección ligados a la PHR en la solución de conjugado. Los micropocillos se lavan por segunda vez para eliminar cualquier material no adherido. Si el antígeno está presente en la muestra del paciente, se desarrolla un color azul con la adición de TMB. La reacción se detiene mediante la adición de solución de parada, donde se desarrolla un color amarillo. La densidad óptica se encuentra utilizando un lector de microplacas a 450 nm y una longitud de onda de referencia de 620/630 nm. Los valores de absorbancia corregidos se calculan y luego se borran antes de calcular las unidades de EIA.

REACTIVOS PROPORCIONADOS

REACTIVO	N.º de ref.	CANTIDAD	DESCRIPCIÓN	Símbolo en etiqueta	Símbolo de peligro
Placa de micropocillos	AGMMW1	96 micropocillos	1 placa de 96 pocillos, recubierta con anticuerpos monoclonales IgG anti- <i>Aspergillus</i> , envasada en una bolsa de Mylar con una bolsa desecante	1	N/A
Tampón de lavado 20X	AGMWB2	50 ml	Tampón de lavado de EIA 20X, contiene 0,4 % de Tween20, 0,2 % de ProClin	2	N/A
Tampón de pretratamiento	AGMSTB	10 ml	Contiene solución de EDTA al 4 %, 0,2 % de ProClin	3	
Corte del calibrador	AGMCC1	1,5 ml	1-5 ng/ml de <i>Asp.</i> galactomannan en una solución de BSA; contiene <0,2 % de ProClin	4	N/A
Control positivo	AGMPC1	1,5 ml	5-15 ng/ml de <i>Asp.</i> galactomannan en una solución de BSA; contiene <0,2 % de ProClin	+	N/A
Control negativo	AGMNC1	1,5 ml	La solución de BSA contiene <0,2 % de ProClin	-	N/A
Conjugado	AGMDA1	10 ml	<0,3 mg/ml de anticuerpos de <i>Aspergillus</i> conjugados con PHR	5	N/A
Sustrato	EIATUS	10 ml	Solución tamponada que contiene tetrametilbencidina (TMB)	6	N/A
Solución de parada	EIASS2	10 ml	<5 % de ácido metanosulfónico	7	

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

- Todo el kit de prueba EIA AGM debe almacenarse entre 2 °C y 8 °C hasta las fechas de vencimiento indicadas en las etiquetas. Todos los reactivos deben volver a almacenarse entre 2 °C y 8 °C inmediatamente después de su uso.
- Evite la exposición prolongada del sustrato (6) a la luz.
- Los micropocillos no utilizados (1) deben volver a colocarse en la bolsa resellable de Mylar, que se ha de sellar inmediatamente una vez abierta y almacenar entre 2 ° y 8 °C. Se ha de extremar precaución para garantizar que la bolsa de material higroscópico permanezca en la bolsa con los pocillos no utilizados.
- Se puede utilizar tampón de lavado 1X (2 diluido a 1X) durante 14 días si se almacena entre 2 °C y 30 °C cuando no se usa. Siempre verifique si hay signos obvios de contaminación en cada nuevo día de prueba.

PREPARACIONES DEL REACTIVO

- Todo el kit, incluidas las tiras de la placa de micropocillos (1), debe estar a una temperatura de entre 18 °C y 25 °C antes y durante el uso. Separe suficientes tiras para realizar las pruebas del día y vuelva a colocar las tiras sin usar en la bolsa con cierre hermético (véase arriba).
- Prepare una solución de tampón de lavado 1X mezclando 19 partes de agua desionizada con 1 parte de AGMWB2 (2). Utilice tampón de lavado 1X como blanco.
- AGMCC1 (4), AGMPC1 (+) y AGMNC1 (-) deben tratarse con AGMSTB (3). El blanco no se trata.
- Los siguientes reactivos están listos para usar: AGMSTB (3), AGMDA1 (5), EIATUS (6) y EIASS2 (7).

PRECAUCIONES DE LOS REACTIVOS

- A. IMMY no puede garantizar el rendimiento de sus productos si se utilizan con materiales comprados a otros fabricantes. **No intercambiar reactivos de diferentes números de lote del kit o de otros fabricantes.**
- B. El usuario asume toda la responsabilidad por cualquier modificación a los procedimientos aquí publicados. Utilice únicamente los protocolos descritos en este prospecto. No se han evaluado tiempos o temperaturas de incubación distintos de los especificados en el procedimiento que se indica a continuación, por lo que se pueden producir resultados inexactos.
- C. No se deben utilizar el kit ni los reactivos del kit después de la fecha de caducidad indicada.
- D. El tampón de pretratamiento (N.º de ref.: AGMSTB) y la solución de parada (N.º de ref.: EIASS2) están etiquetados:



H319	Provoca irritación ocular grave.
P264	Lavarse las manos concienzudamente después de la manipulación.
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P305 + P351 + P338	EN CASO DE ENTRAR EN CONTACTO CON LOS OJOS, enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. En caso de llevar puestas lentes de contacto, quitárselas si es fácil hacerlo. Continuar enjuagando.
P337 + P317	Si la irritación ocular continúa, acudir a un médico.
H402	Nocivo para la vida acuática.
P273	Evitar su liberación al medioambiente.
P501	Eliminar el contenido y el recipiente de acuerdo con las normas locales.
H290	Puede ser corrosivo con los metales.
P234	Conservar únicamente en el recipiente original.
P390	Absorber los derrames para evitar daños materiales.
P406	Almacenar en un recipiente resistente a la corrosión con revestimiento interior resistente.

INFORMACIÓN PREVENTIVA Y SOBRE RIESGOS

Consulte las fichas de datos de seguridad (FDS) del producto para ver las notas de peligro y de precaución.

ADVERTENCIAS PARA LOS USUARIOS

- A. **Solo para uso de diagnóstico in vitro.**
- B. Solo con prescripción.
- C. Use ropa de protección, incluida una bata de laboratorio, protección ocular/ facial y guantes desechables, y manipule los reactivos del kit y las muestras de los pacientes conforme a las Buenas Prácticas de Laboratorio aplicables. Lávese las manos concienzudamente después de realizar el ensayo.
- D. Mantenga técnicas y patrones de pipeteo adecuados durante todo el procedimiento para garantizar resultados óptimos y reproducibles.
- E. No salpique al dispensar o aspirar reactivos de los pocillos, ya que provocaría errores.
- F. Los derrames biológicos deben limpiarse a fondo con un desinfectante eficaz. Los desinfectantes que se pueden utilizar incluyen (entre otros) una solución de lejía al 10 %, etanol al 70 % o Wescodyne Plus™ al 0,5 %. Es posible que los materiales utilizados para limpiar los derrames deban eliminarse como desechos de riesgo biológico.
- G. Un lavado insuficiente puede provocar exceso de reactividad en cualquier protocolo de EIA.
- H. Deseche todas las muestras y materiales utilizados para realizar el ensayo como si contuvieran agentes infecciosos. Los desechos químicos y con riesgo biológico del laboratorio deben manipularse y desecharse de acuerdo con todos los reglamentos locales, regionales y nacionales.
- I. Evite todo contacto con la solución de parada (ácido metanosulfónico). Si se produce exposición cutánea u ocular, lave inmediatamente con abundante agua.
- J. Consulte la sección Información preventiva y sobre riesgos para conocer los riesgos asociados con reactivos específicos. Las fichas de datos de seguridad están disponibles bajo petición.

PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

- A. Este ensayo solo debe ser realizado por usuarios de laboratorio profesionales y capacitados.
- B. **SI LAS MUESTRAS CONGELADAS DE SUERO O LBA SE ALMACENAN EN CONDICIONES DESCONOCIDAS PUEDEN PROPORCIONAR RESULTADOS FALSOS POSITIVOS DEBIDO A LA CONTAMINACIÓN CON HONGOS O BACTERIAS.**
- C. No se deben utilizar el kit ni los reactivos del kit después de la fecha de caducidad indicada.
- D. Utilice materiales limpios y libres de polvo para minimizar la posibilidad de contaminación con esporas de *Aspergillus* del medioambiente. Debido a que el galactomanano es estable al calor, la esterilización del material utilizado no garantiza la ausencia de antígeno contaminante. Los materiales libres de pirógenos son óptimos, pero se puede utilizar el material estándar con las precauciones adecuadas.
- E. No vierta ningún reactivo no utilizado de nuevo en el recipiente original.

- F. Mantenga técnicas y patrones de pipeteo adecuados durante todo el procedimiento para garantizar resultados óptimos y reproducibles. Cuando pipetee controles y muestras, utilice puntas de pipeta individuales para evitar el arrastre de muestras.
- G. Limite la exposición de las muestras y los componentes del kit (sueros, fluido LBA, tampones, controles) o los recipientes abiertos (placas, tubos, puntas de pipeta) al aire.
- H. No utilice micropocillos que hayan estado almacenados en una bolsa Mylar abierta, ya que la exposición a la humedad puede dar lugar a resultados inexactos.
- I. Se requiere un lector de longitud de onda dual, con absorbancias leídas a 450 nm y 620/630 nm. Este ensayo no se ha validado con un lector de longitud de onda única ni con ninguna otra longitud de onda de referencia.
- J. No confíe en la temperatura que muestran los aparatos de calentamiento. La temperatura del bloque térmico/baño de agua debe confirmarse con un termómetro calibrado separado para evaluar de forma independiente la temperatura real. Se deben alcanzar 120 °C dentro del bloque térmico y 100 °C dentro del baño de agua.
- K. No cambie indistintamente de un método de tratamiento térmico a otro. Solo se debe utilizar un método en función de las capacidades del laboratorio.
- L. Tome precauciones para evitar lesiones por quemaduras si se utiliza un baño de agua para aplicar el método de tratamiento térmico.
- M. Realice el pretratamiento únicamente para el número de muestras que caben en una configuración equilibrada en la centrífuga. Evite retrasos en el procesamiento durante el pretratamiento. Para una reactividad óptima, las muestras deben centrifugarse **inmediatamente**.
- N. Los resultados leídos después de la ventana de lectura de 15 minutos no son válidos.
- O. Los resultados entre diferentes ensayos de galactomanano de *Aspergillus* no se pueden comparar.

RECOGIDA DE MUESTRAS

Las muestras deben recogerse asépticamente utilizando técnicas establecidas por personal cualificado. Al manipular muestras de pacientes, se deben tomar las medidas adecuadas para evitar la exposición a los agentes etiológicos que pudiera haber presentes. No se ha establecido el uso de muestras que no sean suero o LBA. Para obtener resultados óptimos, se deben utilizar muestras recolectadas asépticamente.

Las muestras en tránsito entre laboratorios deben mantenerse entre 2 °C y 8 °C. Procese y analice las muestras a su llegada. Si se produce un retraso en el procesamiento de la muestra, se permite el almacenamiento durante un máximo de 2 semanas a <-20 °C, o durante 10 días entre 2 °C y 8 °C. Para un almacenamiento más prolongado, almacene la muestra a -80 °C. Las muestras se pueden someter a un máximo de 5 ciclos de congelación/descongelación. Una muestra con un resultado positivo muy bajo podría volverse negativa después del almacenamiento. Los especímenes previamente congelados deben mezclarse completamente después de descongelarlos, antes de la prueba. Las muestras deben llevarse a temperatura ambiente antes del ensayo (18-25 °C).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los controles de calibrador, positivo y negativo deben tratarse previamente antes de la realización del ensayo. El blanco no requiere pretratamiento antes de la prueba. Todos los controles (AGMCC₁, AGMPC₁, AGMNC₁, blanco) deben probarse en cada serie. Los resultados de AGMCC₁, AGMPC₁, AGMNC₁ y blanco se utilizan para validar la serie (consulte Control de calidad y resultados esperados). Trate los controles apropiados para cada serie al mismo tiempo que la muestra de suero/LBA. **A continuación se describen dos métodos para el tratamiento térmico. Solo se debe utilizar un método en función de las capacidades del laboratorio.** El éxito de la prueba requiere el estricto cumplimiento de la temperatura prescrita y la capacidad del equipo.

Pretratamiento de controles, suero y LBA:

1. Coloque 100 µl de tampón pretratamiento (3) en tubos individuales de microcentrífuga resistentes al calor con tapón de rosca (u otros tubos con cierre).
2. Agregue 300 µl de AGMCC₁, AGMPC₁, AGMNC₁, suero fresco o LBA en cada tubo de pretratamiento. El blanco no requiere pretratamiento.
3. Enrosque bien los tapones para evitar que se abran durante el calentamiento y agite las muestras.
4. Trate térmicamente todas las muestras y los controles apropiados utilizando **uno de los siguientes métodos** según las capacidades del laboratorio*:

Opción de bloque térmico: coloque los tubos en un bloque térmico durante 6-8 minutos a 120 °C.

O

Opción de baño de agua: coloque los tubos en un baño de agua durante 6-8 minutos a 100 °C.

5. Retire los tubos del bloque térmico o del baño de agua hirviendo e **inmediatamente** colóquelos en la centrífuga.
6. Centrifugue la muestra durante 5 minutos a 10 000-14 000 x g, a temperatura ambiente (18-25 °C).
7. Retire los tubos de microcentrífuga y analice los sobrenadantes siguiendo el Procedimiento del ensayo. Si es necesario, las muestras pretratadas (sobrenadante con pellet) y los controles se pueden almacenar entre 2 °C y 8 °C hasta 24 horas antes de la prueba.

*Véase Precauciones para los usuarios

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Paso 1	Subdivida suficientes reactivos necesarios para las pruebas que vayan a realizarse durante el día. Retorne los reactivos restantes al almacenamiento en frío (2-8 °C). Lleve todos los reactivos subdivididos y la bolsa de Mylar que contiene la placa de micropocillos (1) entre 18 °C y 25 °C. (NOTA: Al dividir en alícuotas el sustrato (6), proteja el reactivo de la luz)
Paso 2	Separe suficientes tiras recubiertas de anticuerpos de captura de la placa de micropocillos (1) para control positivo (+), control negativo (-), blanco (2 diluido a 1X), corte del calibrador (4) y muestras de pacientes e introdúzcalas en el soporte de micropocillos. Los micropocillos no utilizados deben volver a colocarse en la bolsa de Mylar resellable, sellarse inmediatamente después de abrirse y almacenarse entre 2 °C y 8 °C. Se ha de extremar precaución para garantizar que la bolsa de material higroscópico permanezca en la bolsa con los pocillos no utilizados.

	<p>Utilice un micropocillo para el control positivo (+), un micropocillo para el control negativo (-), un micropocillo para el blanco (2 diluido a 1X) y dos micropocillos para el corte del calibrador (4).</p> <p>Los controles apropiados deben tratarse previamente a la realización del ensayo. <u>No</u> trate el blanco.</p>
Paso 3	Prepare un tampón de lavado 1X (2 diluido a 1X con agua destilada o desionizada). Esto se utilizará para el blanco y el tampón de lavado.
Paso 4	Trate los controles (AGMCC1 4, AGMPC1 + y AGMNC1 -) y las muestras utilizando el tampón de pretratamiento (3) conforme a las instrucciones sobre “Pretratamiento de controles, suero y LBA” que se citan anteriormente. No pretrate el blanco.
Paso 5	<p>Después de completar el pretratamiento y la preparación de la muestra, agregue 100 µl de lo siguiente a micropocillos separados:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tampón de lavado 1X (2 diluido a 1X), que sirve como blanco para el ensayo • Control positivo (+) • Control negativo (-) • Corte del calibrador (4) - 2 pocillos • Muestras de pacientes <p>Registre la posición de cada control, blanco y muestra.</p>
Paso 6	Cubra la placa con un sellador de placas u otro medio para evitar la evaporación, asegurándose de que toda la superficie quede cubierta y sea impermeable.
Paso 7	Incuba la placa a 37 °C ±1 °C durante 60 minutos ±5 minutos.
Paso 8	Retire el sellador de placas y, con una pipeta, aspire el contenido de los micropocillos y deséchelo en un contenedor para residuos de riesgo biológico, cambiando las puntas para cada micropocillo.
Paso 9	Con un lavador de placas EIA o una pipeta multicanal, llene todos los micropocillos con 300 µl de tampón de lavado 1X (2) preparado en el Paso 3. Vierta el contenido de la placa después del llenado. Repita para un total de 5 lavados.
Paso 10	Después del último lavado, golpee la placa sobre una pila limpia de toallas de papel u otro material limpio y absorbente con la fuerza suficiente para eliminar la mayor cantidad de tampón de lavado 1X restante (2) como sea posible.
Paso 11	Agregue 100 µl de conjugado (5) a cada micropocillo.
Paso 12	Cubra la placa con un sellador de placas u otro medio para evitar la evaporación, asegurándose de que toda la superficie quede cubierta y sea impermeable.
Paso 13	Incuba la placa a 37 °C ±1 °C durante 30 minutos ±5 minutos.
Paso 14	Retire el sellador de placas y, con una pipeta, aspire el contenido de los micropocillos y deséchelo en un contenedor para residuos de riesgo biológico, cambiando las puntas para cada micropocillo.
Paso 15	Con un lavador de placas EIA o una pipeta multicanal, llene todos los micropocillos con 300 µl de tampón de lavado 1X (2) preparado en el Paso 3. Vierta el contenido de la placa después del llenado. Repita hasta un total de 5 lavados.
Paso 16	Después del último lavado, golpee la placa sobre una pila limpia de toallas de papel u otro material limpio y absorbente con la fuerza suficiente para eliminar la mayor cantidad de tampón de lavado 1X restante (2) como sea posible.
Paso 17	Añada 100 µl de sustrato (6) en cada micropocillo. Inicie un temporizador durante 30 minutos (±5 minutos) cuando se añada 6 al primer micropocillo.

Paso 18	Cubra la placa con un sellador de placas u otro medio para evitar la evaporación, asegurándose de que toda la superficie quede cubierta y sea impermeable.
Paso 19	Incube a 37 °C ±1 °C durante el resto del temporizador de 30 minutos.
Paso 20	Retire el sellador de placas y agregue 100 µl de solución de parada (7) a cada micropocillo en el mismo orden que en el Paso 17.
Paso 21	Lea y registre los resultados (véase «Lectura de la prueba»). (NOTA: La lectura debe realizarse en un máximo de 15 minutos).

LECTURA DE LA PRUEBA

- A. **Los resultados leídos después de la ventana de lectura de 15 minutos no son válidos.**
- B. Mezcle golpeando ligeramente el lateral de la placa o agitando sobre la encimera durante 1-5 segundos.
- C. Limpie con cuidado la parte inferior de los pocillos con un paño limpio sin pelusa.
- D. Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm y 620/630 nm. Blanco en el tampón de lavado 1X (2 diluido a 1X).
1. Se requiere un lector de doble longitud de onda, con absorbancias a 450 nm y 620/630 nm. Este ensayo no se ha validado con un lector de longitud de onda única ni con ninguna otra longitud de onda de referencia.
- E. Es necesario leer los resultados en un plazo no superior a 15 minutos después de añadir la solución de parada.
- F. Deseche los materiales de análisis usados como residuos peligrosos y conserve el soporte de los pocillos.
- G. Desinfecte el soporte de los pocillos con un desinfectante, como:
1. Una solución de lejía al 10 %
 2. Etanol al 70 %
 3. Lysol marca I.C.™ al 1 %

NOTA: Los cálculos y los resultados esperados se encuentran en “Control de calidad y resultados”.

MATERIALES PROPORCIONADOS

Véase la sección REACTIVOS

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- A. Agua destilada o desionizada, para dilución del tampón de lavado concentrado
- B. Papel absorbente
- C. Temporizador
- D. Agitador de vórtice
- E. Pipetas mecánicas capaces de administrar rangos de 100-300 µl y puntas desechables
- F. Selladores de placas u otros medios para evitar la evaporación

- G. Tubos con tapón de rosca para microcentrífuga de 1,5-2,0 ml (IMMY n.º de ref. SCT050 o equivalente) capaces de admitir calentamiento a 120 °C (bloque térmico) o 100 °C (baño de agua hirviendo) para el tratamiento de muestras
- H. Bloque térmico capaz de alcanzar los 120 °C o baño de agua capaz de alcanzar los 100 °C para el tratamiento de muestras
- I. Centrífuga de laboratorio para tubos de 1,5-2,0 ml con capacidad para 10 000-14 000 x g
- J. Incubadora ajustada a 37 °C
- K. Lavadora de microplacas o pipeta mecánica multicanal para lavar
- L. Lector de microplacas capaz de leer absorbancias a 450 y 620/630 nm

CONTROL DE CALIDAD Y RESULTADOS

1. Control de calidad:

Un ensayo se considera válido cuando el corte del calibrador (CC), el control positivo (PC), el control negativo (NC) y el blanco (tampón de lavado 1X) se encuentran dentro de los rangos aceptables, como se define en las tablas ubicadas en la sección *Resultados esperados*.

A fin de garantizar la calidad de los reactivos deben incluirse el control positivo, el control negativo, el corte del calibrador y el blanco con cada lote de muestras de pacientes. Los controles positivo y negativo están previstos para supervisar fallos sustanciales en los reactivos. El control positivo no debe utilizarse como indicador de precisión. Si los resultados del control positivo y/o el control negativo y/o el corte del calibrador y/o el blanco no están dentro de estos parámetros, los resultados de la prueba del paciente deben considerarse no válidos y el ensayo debe repetirse con un nuevo conjunto de muestras y controles pretratados.

Se pueden analizar controles adicionales de acuerdo con las pautas o los requisitos de los reglamentos locales, estatales o federales, o de las organizaciones de acreditación.

2. Cálculos:

Calcule las unidades de EIA de la siguiente manera:

1. Calcule las absorbancias corregidas de los controles, el blanco y las muestras de pacientes a partir de los datos sin procesar:

$$\text{Absorbancia corregida} = \text{Absorbancia de muestra } 450 \text{ nm} - \text{Absorbancia de muestra } 630 \text{ nm}$$

2. Calcule las absorbancias en blanco de los controles, el blanco y las muestras de pacientes a partir de las absorbancias corregidas:

$$\text{Absorbancia en blanco}$$

$$= \text{Absorbancia de muestra corregida} - \text{Absorbancia de blanco corregida}$$

3. Calcule el valor promedio (media) para los dos micropocillos de corte del calibrador usando las absorbancias en blanco.
4. Calcule las unidades de EIA de la muestra:

$$\text{Unidades de EIA} = \frac{\text{Absorbancia en blanco de muestra}}{\text{Absorbancia media de corte del calibrador en blanco}}$$

3. Resultados esperados:

CONTROLES	VALORES ACEPTABLES
Corte del calibrador	Absorbancia en blanco de 0,150-0,300
PC	2,5-4,0 unidades de EIA
NC	$\leq 0,1$ unidades de EIA
Blanco	Absorbancia corregida $\leq 0,06$

RESULTADOS	UNIDADES DE EIA
Negativo	$< 0,20$ unidades de EIA
Positivo	$\geq 0,20$ unidades de EIA

LIMITACIONES

- A. Un resultado negativo **no** excluye el diagnóstico de aspergilosis.
- B. AGM101 está diseñado para usarse con muestras de suero y LBA. Este ensayo no ha sido validado en muestras distintas del suero y LBA.
- C. No se ha determinado el rendimiento de los reactivos cuando se exponen a fluctuaciones de temperatura más allá de las exigidas por el procedimiento del ensayo.
- D. Utilice únicamente los protocolos descritos en este prospecto. Los tiempos o temperaturas de incubación distintos a los especificados pueden dar resultados inexactos.
- E. No se ha establecido el rendimiento de AGM101 para la lectura manual y/o determinación visual de resultados.
- F. Un lavado inadecuado durante el procedimiento de ensayo puede causar una reactividad de fondo excesiva.
- G. Es posible que los micropocillos de muestras de pacientes negativos se contaminen con micropocillos de muestras de pacientes/controles positivos si el contenido de un micropocillo se derrama en otro micropocillo. Esto podría deberse a una manipulación brusca de la microplaca o una técnica de pipeteo deficiente al agregar reactivos.
- H. Las pruebas positivas deben confirmarse en áreas o grupos de pacientes donde se sepa que los organismos que reaccionan de forma cruzada con *Aspergillus spp.* son endémicas o representan un riesgo. Se ha observado cierta reactividad cruzada con muestras positivas para *Histoplasma* y, por lo tanto, esto debe tenerse en cuenta en áreas endémicas, incluidas partes de los Estados Unidos.
- I. No se ha evaluado la reactividad cruzada de AGM101 con muestras de LBA.
- J. No se evaluó el potencial de interferencia de AGM101 con muestras de LBA.
- K. AGM101 puede mostrar una detección reducida de galactomanano en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC) y síndrome de Job^{12,13}.

- L. Se sabe que organismos fúngicos como *Talaromyces marneffe*, *Candida*, *Blastomyces*, *Histoplasma* y *Cryptococcus* reaccionan de forma cruzada con otros ensayos de galactomanano¹⁴. No se ha evaluado la reactividad cruzada de AGM101 con otros hongos, excepto *Histoplasma*.
- M. No se ha evaluado la reactividad cruzada de AGM101 con PLASMA-LYTE™. Ha habido informes de reacciones positivas ante el galactomanano asociadas con PLASMA-LYTE™ en varias observaciones debido a problemas de reactividad cruzada o contaminación¹⁵⁻¹⁷. Por lo tanto, se debe considerar la posible administración de PLASMA-LYTE™ al interpretar los resultados de esta prueba.
- N. No se ha evaluado la reactividad cruzada de las muestras de fluido LBA con *Mycoplasma pneumoniae* o los fármacos anestésicos/lubricantes utilizados para adormecer el área del cuello/garganta para el proceso de aspiración.
- O. No se ha evaluado la reactividad cruzada de AGM101 con el lipoglicano bifidobacteriano¹⁸.
- P. AGM101 no está diseñado para supervisar la terapia.
- Q. El uso de terapia antifúngica activa contra moho en algunos pacientes con aspergilosis invasiva puede tener como resultado una reducción de la sensibilidad con AGM101.
- R. El ensayo no debe realizarse como un procedimiento de detección para la población general. El valor predictivo de un resultado positivo o negativo depende de la probabilidad previa al ensayo de que esté presente la enfermedad de aspergilosis. Los ensayos solo deben realizarse cuando la evidencia clínica sugiere el diagnóstico de aspergilosis.
- S. Los resultados entre diferentes ensayos de galactomanano de *Aspergillus* no se pueden comparar.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

1. Valores previstos

La frecuencia de la aspergilosis depende de varios factores, incluida la población de pacientes, el tipo de institución y la epidemiología. La prevalencia esperada de aspergilosis invasiva en pacientes inmunocomprometidos puede variar del 5 % al 20 %¹⁹.

2. Sensibilidad analítica (C95)

Se evaluó la sensibilidad analítica del EIA de AGM clarus añadiendo suero y fluido LBA con antígeno de galactomanano de *Aspergillus* a 3,00 ng/ml y probando concentraciones diluidas 8 veces en serie (1:2). Cada una de las concentraciones de suero se probó un mínimo de 27 réplicas, mientras que las concentraciones de fluido LBA se probaron para un total de 10 réplicas (cada una).

Se determinó la sensibilidad analítica mediante la búsqueda de la intersección en la que el 95 % de los resultados fueron positivos y es de aproximadamente 0,40-0,50 ng/ml tanto para el suero como para el fluido LBA.

3. Efecto de gancho de dosis altas

El efecto de gancho de dosis altas se evaluó internamente analizando suero humano y LBA enriquecido con antígeno de GM de *Aspergillus* en el EIA de AGM clarus. El EIA AGM no mostró

un efecto de gancho completo (resultados falsos negativos) al analizar muestras de suero y LBA que contenían concentraciones extremadamente altas (hasta 260 µg/ml).

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA	UNIDADES MEDIA DE EIA	RESULTADO
260 µg/ml de LBA	11,810	Positivo
130 µg/ml de LBA	11,852	Positivo
65 µg/ml de LBA	11,664	Positivo
32 µg/ml de LBA	11,975	Positivo
260 µg/ml de suero	12,487	Positivo
130 µg/ml de suero	12,565	Positivo
65 µg/ml de suero	12,633	Positivo
32 µg/ml de suero	12,280	Positivo

4. Interferencia

Se evaluó el potencial de interferencia del EIA de AGM clarus en suero hemolizado, icterico y lipémico. Estos sueros no presentan interferencias en el ensayo.

5. Reactividad cruzada

Se evaluó la reactividad cruzada del EIA de AGM clarus frente a un panel de muestras de suero de pacientes con una variedad de patologías diferentes. Los resultados de este ensayo se muestran en la siguiente tabla:

PATOLOGÍA	NÚMERO DE MUESTRAS	% POSITIVOS
<i>Sífilis</i>	10	0 % (0/10)
<i>Toxoplasmosis</i>	8	0 % (0/8)
<i>VHA</i>	10	0 % (0/10)
<i>ANA</i>	10	0 % (0/10)
<i>Rubeola</i>	10	0 % (0/10)
<i>CMV</i>	5	0 % (0/5)
<i>Factor reumatoide</i>	10	0 % (0/10)
<i>Micoplasma</i>	10	0 % (0/10)
<i>VHC</i>	10	0 % (0/10)
<i>Cáncer*</i>	15	0 % (0/15)
<i>Histoplasma**</i>	8	12 % (1/8)

* Tipos de cáncer evaluados: 1 sarcoma, 5 linfomas, 1 neuroblastoma, 5 mielomas, 1 cáncer de pulmón y 1 cáncer renal

** La única muestra de suero con reacción cruzada de *Histoplasma* también fue positiva en otro EIA *Aspergillus* GM comercialmente disponible, con un índice de GM de 7,524, en comparación con 0,498 unidades de EIA en el AGM101 clarus. En particular, una segunda muestra de suero de *Histoplasma* también resultó positiva (índice de GM de 2,269) en el mismo EIA de GM disponible comercialmente, lo que tuvo como resultado una tasa de reactividad cruzada de *Histoplasma* del 25 % (2/8), en comparación con el 12 % para el AGM101 clarus.

6. Precisión

La precisión (reproducibilidad) del EIA de AGM clarus se ha evaluado mediante la realización de controles y un panel de tres muestras de suero y cuatro muestras de LBA. El panel de muestras se analizó una vez al día durante un total de cinco días, en dos lotes diferentes, por tres operadores (un total de 30 evaluaciones por muestra). Muestras analizadas: controles de ensayo (AGMCC1, AGMPC1, AGMNC1, 1 tampón de lavado/blanco), dos positivos bajos (1 suero, 1 LBA), dos positivos moderados (1 suero, 1 LBA) y tres negativos (1 suero, 2 LBA).

Para mayor precisión, se calcularon la media, la desviación estándar, el % CV, el % de positivos y el % de negativos para los resultados de las unidades de EIA. En la tabla siguiente se muestran los resultados:

TIPO DE MUESTRA	MEDIA (UNIDAD DE EIA)	DE	% CV	% POSITIVOS	% NEGATIVOS
Suero positivo mod.	0,834	0,082	10 %	(30/30) 100 %	(0/30) 0 %
Suero positivo bajo	0,443	0,041	9 %	(28/28) 100 %	(0/28) 0 %
LBA positivo mod.	0,614	0,086	13 %	(30/30) 100 %	(0/30) 0 %
LBA positivo bajo	0,293	0,051	17 %	(30/30) 100 %	(0/30) 0 %
LBA 1 negativo	0,039	0,037	N/A	(0/30) 0 %	(30/30) 100 %
LBA 2 negativo	-0,008	0,035	N/A	(0/30) 0 %	(30/30) 100 %
Suero negativo	0,003	0,038	N/A	(0/30) 0 %	(30/30) 100 %

7. Comparación de métodos

El EIA de AGM clarus se ha comparado con un EIA de antígeno de GM de *Aspergillus* comercialmente disponible en un estudio externo utilizando muestras retrospectivas. En ambos ensayos se analizó un total de 319 muestras (272 de suero, 47 de LBA). Se ha realizado un análisis de estos datos para determinar el porcentaje de acuerdo positivo y el porcentaje de acuerdo negativo. En las tablas siguientes se muestran los resultados de esta comparación:

		EIA de GM	
		Pos.	Neg.
EIA de AGM clarus de IMMY	Pos.	32	1
	Neg.	13	226

		EIA de GM	
		Pos.	Neg.
EIA de AGM clarus de IMMY	Pos.	16	1
	Neg.	3	27

Suero	Calculado	IC del 95 %
% acuerdo positivo	71,1 %	56,6 %-82,3 %
% acuerdo negativo	99,6 %	97,5 %-99,9 %

Fluido LBA	Calculado	IC del 95 %
% acuerdo positivo	84,2 %	62,4 %-94,5 %
% acuerdo negativo	96,4 %	82,3 %-99,4 %

8. Rendimiento clínico

Se ha realizado un estudio externo basado en los Criterios clínicos para la AI de la EORTC y el MSG de 2020 para determinar la sensibilidad y la especificidad del EIA de AGM clarus mediante la evaluación de 290 muestras retrospectivas (254 de suero, 36 de fluido LBA) de pacientes con riesgo de AI. En las tablas siguientes se muestran los resultados de esta comparación:

		EORTC/MSG	
		Probados/ Probables	Sin AI
Suero	Pos.	32	0
	Neg.	6	216
EIA de Asp. GM EIA de GM			

	Suero	Calculado	IC del 95 %
	Sensibilidad	84,2 %	69,6 %-92,6 %
Especificidad	100,0 %	98,3 %-100 %	

		EORTC/MSG	
		Probados/ Probables	Sin AI
Fluido LBA	Pos.	14	1
	Neg.	2	19
EIA de Asp. GM EIA de GM			

	Fluido LBA	Calculado	IC del 95 %
	Sensibilidad	87,5 %	64,0 %-96,5 %
Especificidad	95,0 %	76,4 %-99,1 %	














9. Procedimientos y materiales de referencia

No existen procedimientos o materiales de medición de referencia disponibles para el usuario.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	SOLUCIÓN
Resultados variables en las réplicas	<ul style="list-style-type: none"> Configure los controles y las muestras en una placa de 96 pocillos separada, limpia y no recubierta Utilice una pipeta multicanal para pipetear desde la placa de 96 pocillos a los micropocillos
Sospecha de contaminación de micropocillos	<ul style="list-style-type: none"> Golpee suavemente la placa para mezclar los reactivos en los micropocillos para evitar salpicaduras Tome precauciones al pipetear para asegurarse de que no se produzcan salpicaduras ni transferencias de micropocillos adyacentes Cambie la punta para cada micropocillo
Absorbancias más bajas de lo esperado (Reactivos demasiado fríos)	<ul style="list-style-type: none"> Asegúrese de que todos los reactivos tengan una temperatura de entre 18 °C y 25 °C antes del ensayo

SÍMBOLOS

	Contiene suficiente para <n> ensayos		Número de catálogo/Número de referencia
	Consultar las instrucciones de uso		Número de lote
	Fabricante		Para uso diagnóstico in vitro
	Fecha de caducidad		Límite de temperatura
	Control positivo		Marca de conformidad CE
	Control negativo		Representante autorizado en la Comunidad Europea/Unión Europea
	Un solo uso		

BIBLIOGRAFÍA

1. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):545-61.
2. Singh N, and Paterson DL. Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):44-69.
3. Soubani AO, Qureshi MA. Invasive pulmonary aspergillosis following bone marrow transplantation: risk factors and diagnostic aspect. *Haematologia (Budap).* 2002;32(4):427-37.
4. Thompson GR 3rd, Young JH. *Aspergillus* Infections. *N Engl J Med.* 2021;385(16):1496-1509.
5. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica.* 2006;91(7):986-9.
6. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis.* 2001;33(5):641-7.
7. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-1821.
8. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 2020;71(6):1367-1376.
9. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;63(4):e1-e60.
10. Mercier T, Dunbar A, de Kort E, Schauwvlieghe A, Reynders M, Guldentops E, et al. Lateral flow assays for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in adult hematology patients: A comparative multicenter study. *Med Myc.* 2019;1-9.

11. van der Peppel RJ, Visser LG, Dekkers OM, de Boer MGJ. The burden of Invasive Aspergillosis in patients with haematological malignancy: A meta-analysis and systematic review. *Journal of Infect.* 2018;76(6):550-562.
12. Walsh T. J., R.L. Schaufele, T. Sein, J. Gea-Banacloche, et al. Reduced expression of galactomannan antigenemia in patients with Invasive Aspergillosis and chronic granulomatous disease or Job's syndrome. Presentado en: 40.^a Reunión Anual de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América; octubre de 2002; Arlington, VA. P. 105 ; Abstr. 345.
13. King J, Henriet SSV, Warris A. Aspergillosis in Chronic Granulomatous Disease. *J Fungi (Basel)*. 2016;2(2):15.
14. Min Z, Baddley JW, Rodríguez JM, Moser SA, Patel M. Cross-reactivity of *Aspergillus* galactomannan in an HIV-infected patient with histoplasmosis. *Med Mycol Case Rep*. 2012;1(1):119-122.
15. Hage CA, et al. Plasmalyte as a cause of false-positive results for *Aspergillus* GM in BAL Fluid. *J Clin Microbiol* 2007; 45:676-677.
16. Racil Z, et al. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of Platelia *Aspergillus* test for GM detection in serum. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3141-3142.
17. Spriet I, Lagrou K, Maertens J, Willems L, Wilmer A, Wauters J. Plasmalyte: No Longer a Culprit in Causing False-Positive Galactomannan Test Results. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):795-797.
18. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3925-3931.
19. Denning DW. Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998; 26:781-803.

 IMMY, Inc.
2701 Corporate Centre Drive
Norman, OK 73069 EE. UU.
(405) 360-4669/(800) 654-3639
Fax: (405) 364-1058
Correo electrónico:
info@immy.com
Web: www.immy.com

 
MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany