


clarus
ASPERGILLUS GM
ENZYZME IMMUNOASSAY

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

R_x ONLY

IVD

For In Vitro
Use Only

2°C  8°C



USO PRETENDIDO

O clarus *Aspergillus* Galactomannan EIA (AGM EIA) é um ensaio sanduíche imunoenzimático não automatizado em microplaca usado para detecção qualitativa de *Aspergillus* galactomanana em amostras de soro e lavagem broncoalveolar (LBA) de pacientes com risco de aspergilose invasiva.

O clarus AGM EIA é um teste que pode ser usado como recurso auxiliar para o diagnóstico de aspergilose quando testado em conjunto com outros procedimentos diagnósticos (como cultura microbiológica, exame histológico de amostras de biópsia e evidências radiográficas). Destinado ao uso profissional em laboratório.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Aspergillus spp. são fungos filamentosos comuns encontrados em todo o mundo; eles podem viver tanto em ambientes internos quanto externos. A aspergilose invasiva (AI) é causada pela respiração desses esporos de fungos. A AI é uma das ameaças mais significativas para os receptores de células-tronco hematopoiéticas e transplantes de órgãos sólidos. Indivíduos com o sistema imunológico suprimido devido a doenças como a infecção por HIV/AIDS também apresentam alto risco¹⁻³. Fatores de risco não tradicionais identificados mais recentemente para AI incluem internação em UTI e infecções virais respiratórias⁴. Houve um aumento significativo na incidência de AI nas últimas duas décadas devido ao uso generalizado de tratamentos para algumas dessas condições, como quimioterapia e agentes imunossupressores⁵⁻⁶. Há relatos de que as infecções por *Aspergillus* são responsáveis por até 41% das infecções em todos os pacientes transplantados, com uma taxa de mortalidade impressionante de até 92% nesta população². A AI é de difícil diagnóstico, necessitando de uma abordagem multidimensional que inclui características do paciente, achados clínicos e radiológicos, e evidências micológicas⁷⁻⁹. A detecção precoce e o tratamento da infecção são fundamentais para reduzir a mortalidade associada a esta doença¹⁰⁻¹¹.



O clarus AGM EIA é um ensaio sanduíche, imunoenzimático não automatizado em microplaca que detecta o *Aspergillus* galactomanana em amostras de soro e LBA. Ele pode ser usado como auxiliar no diagnóstico de aspergilose quando testado em conjunto com outros procedimentos diagnósticos (como cultura microbiológica, exame histológico de amostras de biópsia e evidências radiográficas).

PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS

O clarus AGM EIA é um ensaio sanduíche, imunoenzimático não automatizado em microplaca que detecta o *Aspergillus* galactomanana em soro e LBA. Controles, amostras de soro e LBA necessitam de tratamento térmico prévio antes do teste. Após o tratamento prévio, o sobrenadante da amostra e dos controles é pipetado em micropoços revestidos com anticorpos anti-*Aspergillus*. Os micropoços são incubados a 37 °C, e então, são lavados antes da adição do conjugado. Após uma segunda incubação (37 °C) e lavagem, adiciona-se 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Os micropoços passam por uma incubação final (37 °C), e então, adiciona-se a solução de parada. O clarus AGM EIA pode ser executado em menos de 3 horas, e a leitura dos resultados pode ser feita em 15 minutos após a conclusão do teste.

Os anticorpos monoclonais anti-*Aspergillus* IgG são ligados a placas de micropoços e usados como anticorpos de captura. Os anticorpos monoclonais anti-*Aspergillus* IgG conjugados com peroxidase de rábano (HRP) são usados como reagentes de detecção. A galactomanana é um polissacarídeo encontrado na parede celular. Caso a amostra do paciente contenha *Aspergillus* galactomanana, esses antígenos serão ligados aos anticorpos de captura nos micropoços. Antes da adição do conjugado, os micropoços são lavados, o que remove qualquer antígeno não ligado do poço. Isso reduz o risco de resultados falso-negativos devido ao efeito gancho de alta dose. Uma vez que o conjugado é adicionado, o complexo anticorpo-antígeno de captura liga-se aos anticorpos de detecção ligados a HRP na solução do conjugado. Os micropoços são lavados uma segunda vez para remover qualquer material não ligado. Caso o antígeno esteja presente na amostra do paciente, uma cor azul será desenvolvida com a adição de TMB. A reação é interrompida pela adição da solução de parada, onde uma cor amarela é desenvolvida. A densidade óptica é encontrada usando um leitor de microplacas a 450 nm e um comprimento de onda de referência de 620/630 nm. Os valores de OD corrigidos são calculados e então apagados antes de calcular as unidades EIA.

REAGENTES FORNECIDOS

REAGENTE	Nº de REF.	QTD.	DESCRIÇÃO	Símbolo na etiqueta	Símbolo de perigo
Placa de micropoços	AGMMW1	96 micropoços	1 placa de 96 poços revestida com anticorpos monoclonais anti- <i>Aspergillus</i> IgG, embalada em uma bolsa Mylar com bolsa dessecante	1	N.A.
Tampão de lavagem 20X	AGMWB2	50 ml	Tampão de lavagem 20X EIA; contém 0,4% Tween20, 0,2% ProClin	2	N.A.
Tampão de tratamento prévio	AGMSTB	10 ml	Contém solução de 4% EDTA, 0,2% ProClin	3	
Corte do calibrador	AGMCC1	1,5 ml	1-5 ng/ml <i>Asp.</i> galactomannan em solução de BSA; contém < 0,2% ProClin	4	N.A.
Controle positivo	AGMPC1	1,5 ml	5-15 ng/ml <i>Asp.</i> galactomannan em solução de BSA; contém < 0,2% ProClin	+	N.A.
Controle negativo	AGMNC1	1,5 ml	A solução de BSA contém < 0,2% ProClin	-	N.A.
Conjugado	AGMDA1	10 ml	< 0,3 mg/ml de anticorpos contra <i>Aspergillus</i> conjugados com HRP	5	N.A.
Substrato	EIATUS	10 ml	Solução tamponada contendo tetrametilbenzidina (TMB)	6	N.A.
Solução de parada	EIASS2	10 ml	< 5% de ácido metanossulfônico	7	

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DE REAGENTES

- Todo o kit de teste AGM EIA deve ser armazenado entre 2 a 8 °C até as datas de validade indicadas nos rótulos. Todos os reagentes devem ser devolvidos entre 2 a 8 °C imediatamente após o uso.
- Evite a exposição prolongada do substrato (6) à luz.
- Os micropoços não utilizados (1) devem ser colocados de volta no saco Mylar resselável, selados imediatamente após a abertura e armazenados entre 2 a 8 °C. Deve-se tomar cuidado para garantir que a bolsa dessecante permaneça no saco com os micropoços não utilizados.
- Tampão de lavagem 1X (2 diluído a 1X) pode ser usado por 14 dias caso seja armazenado entre 2 a 30 °C quando não estiver em uso. Sempre verifique se há sinais óbvios de contaminação em cada novo dia de teste.

PREPARAÇÕES DE REAGENTES

- Todo o kit, inclusive as tiras da placa de micropoços (1), deve estar entre 18 a 25 °C antes e durante o uso. Separe as tiras suficientes para serem testadas naquele dia e coloque as tiras não utilizadas de volta no saco resselável (veja acima).
- Prepare uma solução 1X de tampão de lavagem misturando 19 partes de água DI com 1 parte de AGMWB2 (2). Use o tampão de lavagem 1X como a determinação em branco.
- AGMCC1 (4), AGMPC1 (+) e AGMNC1 (-) devem ser tratados com AGMSTB (3). A determinação em branco não é tratada.
- Os seguintes reagentes estão prontos para uso: AGMSTB (3), AGMDA1 (5), EIATUS (6) e EIASS2 (7).

PRECAUÇÕES COM OS REAGENTES

- A. A IMMY não pode garantir o desempenho de seus produtos quando usados com materiais adquiridos de outros fabricantes. **Não alterne reagentes de números de lote de kits diferentes ou de outros fabricantes.**
- B. O usuário assume total responsabilidade por qualquer modificação nos procedimentos aqui publicados. Use apenas os protocolos descritos neste folheto informativo. Tempos de incubação ou temperaturas diferentes dos especificados no procedimento listado abaixo não foram avaliados e podem produzir resultados imprecisos.
- C. Não use o kit ou quaisquer reagentes do kit após a data de validade indicada.
- D. O tampão de tratamento prévio (nº de ref.: AGMSTB) e a solução de parada (nº de ref.: EIASS2) são rotulados com:



H319	Causa irritação ocular grave.
P264	Lave bem as mãos após o manuseio.
P280	Use luvas de proteção/roupas de proteção/proteção facial/proteção para os olhos.
P305 + P351 + P338	SE HOUVER CONTATO COM OS OLHOS, enxague com água cuidadosamente por vários minutos. Tire as lentes de contato, se houver e se for possível tirá-las com facilidade, e continue enxaguando.
P337 + P317	Se a irritação nos olhos persistir, procure um médico.
H402	Nocivo à vida aquática.
P273	Evite lançamento no meio-ambiente.
P501	Descarte de conteúdo e embalagem de acordo com regulamentação local.
H290	Pode ser corrosivo para metais.
P234	Mantenha na embalagem original.
P390	Absorva o conteúdo derramado para evitar danos materiais.
P406	Armazene em recipiente resistente à corrosão com revestimento interno resistente.

INFORMAÇÕES DE PERIGO E PRECAUÇÃO

Consulte as fichas de dados de segurança (SDS) do produto para obter informações sobre os perigos e as declarações de precaução.

AVISOS PARA USUÁRIOS

A. Apenas para uso de diagnóstico in-vitro.

B. Apenas Rx

- C. Use roupas de proteção, incluindo jaleco, proteção para os olhos/face e luvas descartáveis; manuseie os reagentes do kit e as amostras do paciente com as boas práticas de laboratório necessárias. Lave bem as mãos após realizar o teste.
- D. Mantenha técnicas e padrões de pipetagem adequados durante todo o procedimento para garantir resultados ideais e reproduzíveis.
- E. Evite respingos ao dispensar ou aspirar reagentes dos micropoços, pois isso causa erros.
- F. Os derramamentos biológicos devem ser limpos completamente com um desinfetante eficaz. Os desinfetantes que podem ser usados incluem (mas não estão limitados a) uma solução de 10% de alvejante, 70% de etanol, ou 0,5% de Wescodyne Plus™. Os materiais usados para limpar derramamentos podem exigir descarte como resíduos com risco biológico.
- G. A lavagem inadequada pode causar reatividade de fundo excessiva em qualquer protocolo EIA.
- H. Descarte todas as amostras e materiais usados para realizar o teste como se contivessem um agente infeccioso. Os resíduos químicos e biológicos de laboratório devem ser manuseados e descartados de acordo com todos os regulamentos locais, regionais e nacionais.
- I. Evite o contato com a solução de parada (ácido metanossulfônico). Caso seja exposto à pele ou aos olhos, lave imediatamente com água em abundância.
- J. Consulte as seções de informações sobre perigos e precauções para os perigos associados a reagentes específicos. As fichas de dados de segurança estão disponíveis mediante solicitação.

PRECAUÇÕES PARA USUÁRIOS

- A. Este ensaio deve ser realizado somente por usuários de laboratório profissionais e treinados.
- B. **AMOSTRAS DE SORO OU LBA CONGELADAS EM CONDIÇÕES DESCONHECIDAS PODEM GERAR RESULTADOS COM FALSO-POSITIVOS DEVIDO À CONTAMINAÇÃO COM FUNGOS E/OU BACTÉRIAS.**
- C. Não use o kit ou quaisquer reagentes do kit após a data de validade indicada.
- D. Use materiais limpos e sem poeira para minimizar a possibilidade de contaminação com esporos de *Aspergillus* do ambiente. Como a galactomanana é termoestável, a esterilização do material utilizado não garante a ausência do antígeno contaminante. Os materiais livres de pirogênio são ideais, mas o material padrão pode ser usado com as devidas precauções.
- E. Não despeje nenhum reagente não utilizado de volta no recipiente original.

- F. Mantenha técnicas e padrões de pipetagem adequados durante todo o procedimento para garantir resultados ideais e reproduzíveis. Ao pipetar controles e amostras, use pontas de pipeta individuais para evitar a transferência de amostras.
- G. Limite a exposição de amostras e componentes do kit (soros, fluido de LBA, tampões, controles) ou recipientes abertos (placas, tubos, ponteiras) ao ar.
- H. Não use micropoços que foram armazenados em um saco Mylar aberto, pois a exposição à umidade pode levar a resultados imprecisos.
- I. É necessário um leitor de comprimento de onda duplo, com absorvâncias lidas em 450 nm e 620/630 nm. Este ensaio não foi validado com um único leitor de comprimento de onda ou em quaisquer outros comprimentos de onda de referência.
- J. Não confie na temperatura exibida por aparelhos de aquecimento. A temperatura do bloco de aquecimento/banho-maria deve ser confirmada por um termômetro calibrado e separado para avaliar independentemente a temperatura real do calor. 120 °C deve ser alcançado dentro do bloco de aquecimento e 100 °C deve ser alcançado dentro do banho-maria.
- K. Não alterne entre os métodos de tratamento térmico. Apenas um método deve ser realizado de acordo com as capacidades do laboratório.
- L. Tome precauções para evitar queimaduras se o banho-maria for usado para realizar o método de tratamento térmico.
- M. Apenas faça o pré-tratamento do número de amostras que cabem em uma configuração balanceada na centrífuga. Evite atrasos no processamento durante o tratamento prévio. Para uma reatividade ideal, as amostras devem ser centrifugadas **imediatamente**.
- N. Os resultados lidos após a janela de leitura de 15 minutos são inválidos.
- O. Os resultados entre diferentes ensaios de *Aspergillus galactomanana* não podem ser comparados.

COLETA DE AMOSTRAS

Colete as amostras assepticamente usando as técnicas estabelecidas pelo pessoal qualificado. Ao manusear as amostras de pacientes, devem ser tomadas medidas adequadas para evitar a exposição a agentes etiológicos potencialmente presentes. A utilização de amostras que não sejam soro ou LBA não foi estabelecida. Para melhores resultados, as amostras coletadas assepticamente devem ser usadas.

As amostras em trânsito entre laboratórios devem ser mantidas entre 2 a 8 °C. Processe e teste as amostras na chegada. Caso haja atraso no processamento da amostra, armazene por até 2 semanas a < -20 °C ou 10 dias entre 2 a 8 °C. Para armazenamento mais longo, armazene a amostra a -80 °C. As amostras podem ser submetidas a um máximo de 5 ciclos de congelamento/descongelamento. Uma amostra com positividade muito baixa pode se tornar negativa após o armazenamento. As amostras previamente congeladas devem ser bem misturadas após o descongelamento antes do teste. As amostras devem ser trazidas à temperatura ambiente antes do teste (18 a 25 °C).

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Os controles positivo, negativo e do calibrador devem ser tratados previamente, antes do teste. A determinação em branco não é tratada previamente antes do teste. Todos os controles (AGMCC₁,

AGMPC1, AGMNC1, determinação em branco) devem ser testados em cada execução. Os resultados de AGMCC1, AGMPC1, AGMNC1 e determinação em branco são usados para validar a execução (consulte controle de qualidade e resultados esperados). Trate os controles apropriados para cada execução simultaneamente à amostra de soro/BAL. **Dois métodos para tratamento térmico são descritos abaixo. Apenas um método deve ser realizado de acordo com as capacidades do laboratório.** O sucesso do teste exige o cumprimento rigoroso da temperatura prescrita e da capacidade do equipamento.

Tratamento prévio de controles, soro e LBA:

1. Coloque 100 µl do tampão de tratamento prévio (3) em tubos de microcentrífuga resistentes ao calor com tampa de rosca individual (ou outros tubos com travamento).
2. Adicione 300 µl de AGMCC1, AGMPC1, AGMNC1, soro fresco ou LBA em cada tubo com tratamento prévio. A determinação em branco não é tratada previamente.
3. Aperte bem as tampas para evitar a abertura durante o aquecimento e vórtice das amostras.
4. Trate com calor todas as amostras e controles apropriados usando **um dos seguintes métodos** de acordo com as capacidades do laboratório*:

Opção de bloco de calor: coloque os tubos em um bloco de calor por 6 a 8 minutos a 120 °C.

OU

Opção de banho-maria: coloque os tubos em banho-maria por 6 a 8 minutos a 100 °C.

5. Remova os tubos do bloco de aquecimento ou do banho-maria em água fervente e coloque **imediatamente** na centrífuga.
6. Gire a amostra por 5 minutos entre 10.000 a 14.000 xg à temperatura ambiente (18 a 25 °C).
7. Remova os tubos de microcentrífuga e teste os sobrenadantes seguindo o procedimento de teste. Caso seja necessário, as amostras (sobrenadantes com pellet) e controles tratados previamente podem ser armazenados a 2 a 8°C por até 24 horas antes do teste.

*Veja precauções para usuários

PROCEDIMENTO DE TESTE

Etapa 1	<p>Fracione uma quantidade suficiente de reagentes necessários para os testes que serão executados naquele dia. Retorne os reagentes restantes para armazenamento a frio (2 a 8 °C).</p> <p>Traga todos os reagentes fracionados e o saco Mylar contendo a placa de micropoços (1) para 18 a 25 °C.</p> <p>(NOTA: Ao fracionar o substrato (6), proteja o reagente da luz)</p>
Etapa 2	<p>Separe as tiras suficientes e revestidas com anticorpos de captura da placa de micropoços (1) para controle positivo (+), controle negativo (-), determinação em branco (2 diluído para 1X), corte do calibrador (4), e amostras de pacientes e insira-os no suporte de micropoços. Os micropoços não utilizados devem ser colocados de volta no saco Mylar resselável, selado imediatamente após a abertura, e armazenados a 2 a 8 °C. Deve-se tomar cuidado para garantir que a bolsa dessecante permaneça no saco com os micropoços não utilizados.</p> <p>Use um micropoço para o controle positivo (+), um micropoço para o controle negativo (-), um micropoço para a determinação em branco (2 diluído para 1X) e dois micropoços para o corte do calibrador (4).</p> <p>Os controles apropriados devem ser tratados antes do teste. <u>Não</u> trate a determinação em branco.</p>

Etapa 3	Prepare o tampão de lavagem 1X (2 diluído a 1X com água destilada ou deionizada). Isso será usado para a determinação em branco e o tampão de lavagem.
Etapa 4	Trate os controles (AGMCC1(4), AGMPC1(+) e AGMNC1(-)) e amostras usando o tampão de tratamento prévio (3) de acordo com as instruções de “Tratamento prévio de controles, soro e LBA” indicadas acima. Não faça o tratamento prévio na determinação em branco.
Etapa 5	Após a conclusão do tratamento prévio e preparação da amostra, adicione 100 µl do seguinte item para separar os micropoços: <ul style="list-style-type: none"> • Tampão de lavagem 1X (2 diluído a 1X), que serve como determinação em branco para o ensaio • Controle positivo (+) • Controle negativo (-) • Corte do calibrador (4) - 2 poços • Amostras de pacientes <p>Registre a posição de cada controle, determinação em branco e amostra.</p>
Etapa 6	Cubra a placa com selador de placas ou outros meios para evitar a evaporação e garantir que toda a superfície esteja coberta e estanque.
Etapa 7	Incube a placa a 37°C ± 1 °C por 60 minutos ± 5 minutos.
Etapa 8	Remova o selador de placas e, usando uma pipeta, aspire o conteúdo dos micropoços e descarte em um recipiente de risco biológico, trocando as pontas entre os micropoços.
Etapa 9	Usando um lavador de placas EIA ou pipeta multicanal, preencha todos os micropoços com 300 µl de tampão de lavagem 1X (2) preparado na Etapa 3. Despeje o conteúdo da placa após o preenchimento. Repita em um total de 5 lavagens.
Etapa 10	Após a lavagem final, bata a placa em uma pilha limpa de toalhas de papel ou outro material limpo e absorvente com força suficiente para remover o máximo possível de tampão de lavagem 1X restante (2).
Etapa 11	Adicione 100 µl de conjugado (5) em cada micropoço.
Etapa 12	Cubra a placa com selador de placas ou outros meios para evitar a evaporação e garantir que toda a superfície esteja coberta e estanque.
Etapa 13	Incube a placa a 37 °C ± 1 °C por 30 minutos ± 5 minutos.
Etapa 14	Remova o selador de placas e, usando uma pipeta, aspire o conteúdo dos micropoços e descarte em um recipiente de risco biológico, trocando as pontas entre os micropoços.
Etapa 15	Usando um lavador de placas EIA ou pipeta multicanal, preencha todos os micropoços com 300 µl de tampão de lavagem 1X (2) preparado na Etapa 3. Despeje o conteúdo da placa após o preenchimento. Repita em um total de 5 lavagens.
Etapa 16	Após a lavagem final, bata a placa em uma pilha limpa de toalhas de papel ou outro material limpo e absorvente com força suficiente para remover o máximo possível de tampão de lavagem 1X restante (2).
Etapa 17	Adicione 100 µl de substrato (6) em cada micropoço. Marque no cronômetro 30 minutos (± 5 minutos) quando 6 for adicionado ao primeiro micropoço.
Etapa 18	Cubra a placa com selador de placas ou outros meios para evitar a evaporação e garantir que toda a superfície esteja coberta e estanque.
Etapa 19	Incube a 37 °C ± 1 °C para o restante do temporizador de 30 minutos.

Etapa 20	Remova o selador de placa e adicione 100 µl de solução de parada (7) em cada micropoço na mesma ordem da Etapa 17.
Etapa 21	Leia e registre os resultados (consulte “Leitura do teste”). (NOTA: a leitura deve ocorrer dentro de 15 minutos.)

LEITURA DO TESTE

- A. **Os resultados lidos após a janela de leitura de 15 minutos são inválidos.**
- B. Misture batendo suavemente a lateral da placa ou agitando na bancada por 1 a 5 segundos.
- C. Limpe cuidadosamente a parte inferior dos micropoços com um tecido limpo e sem fiapos.
- D. Leia a densidade óptica de cada micropoço a 450 nm e 620/630 nm. Determinação em branco no tampão de lavagem 1X (2 diluído a 1X).
 1. É necessário um leitor de comprimento de onda duplo, com absorvâncias em 450 nm e 620/630 nm. Este ensaio não foi validado com um único leitor de comprimento de onda ou em quaisquer outros comprimentos de onda de referência.
- E. Os resultados devem ser lidos dentro de 15 minutos após a adição da solução de parada.
- F. Descarte qualquer material de ensaio usado como resíduo perigoso e guarde o suporte de micropoços.
- G. Desinfete o suporte de micropoços com um desinfetante como:
 1. Uma solução de 10% de água sanitária
 2. Etanol 70%
 3. Lyson 1% marca I.C.™

NOTA: Os cálculos e os resultados esperados podem ser encontrados em “Controle de qualidade e resultados”.

MATERIAIS FORNECIDOS

Consulte a seção REAGENTES

MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- A. Água destilada ou deionizada para diluição de tampão de lavagem concentrado
- B. Papel absorvente
- C. Cronômetro
- D. Agitador de vórtice
- E. Pipetadores capazes de fornecer faixas de 100 a 300 µl e pontas descartáveis
- F. Seladores de placas ou outros meios para evitar a evaporação
- G. Tubos de microcentrífuga com tampa de rosca de 1,5 a 2,0 ml (IMMY nº de Ref. SCT050 ou equivalente) capazes de suportar aquecimento a 120 °C (bloco de calor) ou 100 °C (banho-maria em água fervente) para tratamento de amostras
- H. Bloco de aquecimento capaz de atingir 120 °C ou banho-maria capaz de atingir 100 °C para tratamento de amostras
- I. Centrífuga de laboratório para tubos de 1,5 a 2,0 ml capazes de suportar 10.000 a 14.000 xg
- J. Incubadora ajustada para 37 °C

- K. Lavadora de microplacas ou pipeta multicanal para lavagem
- L. Leitor de microplacas capaz de ler absorvâncias a 450 e 620/630 nm

CONTROLE DE QUALIDADE E RESULTADOS

1. Controle de qualidade:

Um ensaio é considerado válido quando o limite do calibrador (CC), controle positivo (PC), controle negativo (NC) e determinação em branco (tampão de lavagem 1X) estiverem dentro dos intervalos aceitáveis, conforme definido nas tabelas localizadas na seção *Resultados esperados*.

O controle positivo, controle negativo, corte do calibrador e determinação em branco devem ser incluídos em cada lote de amostras do paciente para garantir a qualidade dos reagentes. Os controles positivo e negativo destinam-se a monitorar falhas substanciais do reagente. O controle positivo não deve ser usado como indicador de precisão. Se os resultados do controle positivo e/ou controle negativo e/ou corte do calibrador e/ou determinação em branco não estiverem dentro desses parâmetros, os resultados do teste do paciente devem ser considerados inválidos e o ensaio deve ser repetido com um novo conjunto de controles e amostras tratadas previamente.

Controles adicionais podem ser testados de acordo com as diretrizes ou requisitos de regulamentações locais, estaduais e/ou federais ou de organizações de credenciamento.

2. Cálculos:

Calcule as unidades EIA considerando os seguintes parâmetros:

1. Calcule os ODs corrigidos dos controles, determinação em branco e amostras de pacientes a partir dos dados brutos:

$$OD\ corrigido = OD\ da\ amostra\ 450\ nm - OD\ da\ amostra\ 630\ nm$$

2. Calcule os ODs em branco dos controles, determinação em branco e amostras de pacientes dos ODs corrigidos:

$$OD\ em\ branco = OD\ da\ amostra\ corrigido - OD\ em\ branco\ corrigido$$

3. Calcule o valor médio (média) para os dois micropoços de corte do calibrador usando os ODs em branco.
4. Calcule a amostra em unidades de EIA:

$$Unidades\ EIA = \frac{OD\ da\ amostra\ em\ branco}{OD\ de\ corte\ do\ calibrador\ em\ branco\ médio}$$

3. Resultados esperados:

CONTROLES	VALORES ACEITÁVEIS
Corte do calibrador	OD 0,150 a 0,300 em branco
PC	2,5 a 4,0 unidades EIA

CONTROLES	VALORES ACEITÁVEIS
NC	$\leq 0,1$ unidades EIA
Determinação em branco	$\leq 0,06$ OD corrigido

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

LIMITAÇÕES

- A. Um resultado negativo **não** exclui o diagnóstico de aspergilose.
- B. O AGM101 destina-se ao uso com amostras de soro e LBA. Esse ensaio não foi validado em amostras que não sejam soro e LBA.
- C. O desempenho dos reagentes não foi determinado quando foram expostos a flutuações de temperatura além daquelas exigidas pelo procedimento de teste.
- D. Use apenas os protocolos descritos neste folheto informativo. Tempos de incubação ou temperaturas diferentes das especificadas podem gerar resultados imprecisos.
- E. O desempenho do AGM101 não foi estabelecido para leitura manual e/ou determinação visual de resultados.
- F. A lavagem inadequada durante o procedimento de teste pode causar reatividade de fundo excessiva.
- G. É possível que micropoços de amostras de pacientes negativos sejam contaminados por micropoços de controle positivo/amostras de pacientes caso o conteúdo de um micropoço se espalhe para outro micropoço. Isso pode acontecer devido ao manuseio inadequado da microplaca ou realização da técnica de pipetagem inadequada durante a adição de reagentes.
- H. Testes positivos devem ser confirmados em áreas ou grupos de pacientes onde os organismos conhecidos por reagirem de forma cruzada com *Aspergillus spp.* são endêmicas ou de risco. Alguma reatividade cruzada foi observada com amostras positivas para *Histoplasma* e, portanto, deve ser considerada em áreas endêmicas, inclusive em partes dos Estados Unidos.
- I. O AGM101 não foi avaliado quanto à reatividade cruzada usando amostras de LBA.
- J. O AGM101 não foi avaliado quanto ao potencial de interferência usando amostras de LBA.
- K. O AGM101 pode apresentar detecção reduzida de galactomanana em pacientes com doença granulomatosa crônica (DGC) e síndrome de Job.^{12,13}
- L. Organismos fúngicos como *Talaromyces marneffeii*, *Candida*, *Blastomyces*, *Histoplasma* e *Cryptococcus* são conhecidos por apresentarem reação cruzada com outros ensaios de galactomanana¹⁴. O AGM101 não foi avaliado quanto à reatividade cruzada contra outros fungos, exceto *Histoplasma*.
- M. O AGM101 não foi avaliado quanto à reatividade cruzada com PLASMA-LYTE™. Houve relatos de reações positivas para galactomanana associadas ao PLASMA-LYTE™ em várias observações devido a problemas de reatividade cruzada ou contaminação¹⁵⁻¹⁷. Portanto, qualquer administração de PLASMA-LYTE™ deve ser considerada ao interpretar os resultados do teste.

- N. A reatividade cruzada de amostras de fluido de LBA com *Mycoplasma pneumoniae* ou drogas/lubrificantes anestésicos usados para anestésiar a área do pescoço/garganta para o processo de aspiração não foi avaliada.
- O. O AGM101 não foi avaliado quanto à reatividade cruzada com o lipoglicano bifidobacteriano.¹⁸
- P. O AGM101 não se destina ao monitoramento da terapia.
- Q. O uso de terapia antifúngica ativa em alguns pacientes com aspergilose invasiva pode resultar em sensibilidade reduzida com AGM101.
- R. O teste não deve ser realizado como um procedimento de triagem para a população em geral. O valor preditivo de um resultado positivo ou negativo depende da probabilidade de pré-testagem quanto à presença da doença aspergilose. O teste só deve ser feito quando a evidência clínica sugere o diagnóstico de aspergilose.
- S. Os resultados entre diferentes ensaios de *Aspergillus galactomanana* não podem ser comparados.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

1. Valores esperados

A frequência da aspergilose depende de vários fatores, incluindo a população de pacientes, tipo de instituição e epidemiologia. A prevalência esperada de aspergilose invasiva em pacientes imunocomprometidos pode variar de 5 a 20%¹⁹.

2. Sensibilidade analítica (C95)

A sensibilidade analítica do clarus AGM EIA foi avaliada adicionando soro e fluido de LBA com antígeno contra *Aspergillus galactomannan* a 3,00 ng/ml e testando 8x concentrações de diluição seriada (1:2). Cada concentração do soro foi testada com um mínimo de 27 réplicas, enquanto as concentrações de fluido de LBA foram testadas com um total de 10 réplicas (cada).

A sensibilidade analítica foi determinada encontrando o cruzamento onde 95% dos resultados foram positivos e aproximadamente 0,40-0,50 ng/ml tanto para o soro quanto para o fluido de LBA.

3. Efeito de gancho de alta dose

O efeito de gancho de alta dose foi avaliado internamente testando soro humano e LBA com antígeno *Aspergillus GM* no clarus AGM EIA. O AGM EIA não exibiu efeito de gancho completo (resultados falso-negativos) ao testar amostras de soro e LBA contendo concentrações extremamente altas (até 260 µg/ml).

CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRA	MÉDIA DE UNIDADES 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 soro	12,487	Positivo
130 µg/ml de soro	12,565	Positivo
65 µg/ml de soro	12,633	Positivo
32 µg/ml de soro	12,280	Positivo

4. Interferência

O clarus AGM EIA foi avaliado quanto ao potencial de interferência em soro hemolisado, icterico e lipêmico. Esses soros não demonstram interferência no ensaio.

5. Reatividade cruzada

O clarus AGM EIA foi avaliado quanto à reatividade cruzada contra um painel de amostras de soro de pacientes em uma variedade de patologias diferentes. Os resultados deste teste são mostrados na tabela abaixo:

PATOLOGIA	NÚMERO DE AMOSTRAS	% de POSITIVO
<i>Sífilis</i>	10	0% (0/10)
<i>Toxoplasmose</i>	8	0% (0/8)
<i>Vírus da hepatite A</i>	10	0% (0/10)
<i>Anticorpo antinuclear</i>	10	0% (0/10)
<i>Rubéola</i>	10	0% (0/10)
<i>Citomegalovírus</i>	5	0% (0/5)
<i>Fator reumatoide</i>	10	0% (0/10)
<i>Mycoplasma</i>	10	0% (0/10)
<i>Vírus da hepatite C</i>	10	0% (0/10)
<i>Câncer*</i>	15	0% (0/15)
<i>Histoplasma**</i>	8	12% (1/8)

*Tipos de câncer avaliados: 1x sarcoma, 5x linfomas, 1x neuroblastoma, 5x mieloma, 1x câncer de pulmão e 1x câncer renal

** A única amostra de soro com reação cruzada de *Histoplasma* também foi positiva em outro *Aspergillus* GM EIA comercialmente disponível, com um índice GM de 7,524, comparado a 0,498 unidades EIA no clarus AGM101. Notavelmente, uma segunda amostra de soro de *Histoplasma* também foi positiva (Índice GM de 2,269) no mesmo GM EIA comercialmente disponível, resultando em uma taxa de reatividade cruzada de *Histoplasma* de 25% (2/8) em comparação com 12% para o clarus AGM101.

6. Precisão

A precisão (reprodutibilidade) no clarus AGM EIA foi avaliada pela execução de controles e um painel de três amostras de soro e quatro amostras de LBA. O painel de amostras foi testado uma vez ao dia por um total de cinco dias, em dois lotes diferentes, por três operadores (totalizando 30 avaliações por amostra). Amostras testadas: controles de ensaio (AGMCC1, AGMPC1, AGMNC1, tampão de lavagem 1x/determinação em branco), dois positivos baixos (soro 1x, LBA 1x), dois positivos moderados (soro 1x, LBA 1x) e três negativos (soro 1x, LBA 2x).

Para precisão, a média, o desvio padrão, a % de CV, a % de positivo e % de negativo foram calculados para os resultados das unidades EIA. Os resultados são exibidos na tabela abaixo:

TIPO DE AMOSTRA	MÉDIA (UNIDADE EIA)	SD	% de CV	% de POSITIVO	% de NEGATIVO
Mod. Soro positivo	0,834	0,082	10%	(30/30) 100%	(0/30) 0%
Soro positivo baixo	0,443	0,041	9%	(28/28) 100%	(0/28) 0%
Mod. LBA positivo	0,614	0,086	13%	(30/30) 100%	(0/30) 0%
LBA positivo baixo	0,293	0,051	17%	(30/30) 100%	(0/30) 0%
LBA negativo 1	0,039	0,037	N.A.	(0/30) 0%	(30/30) 100%
LBA negativo 2	-0,008	0,035	N.A.	(0/30) 0%	(30/30) 100%
Soro negativo	0,003	0,038	N.A.	(0/30) 0%	(30/30) 100%

7. Comparação de métodos

O clarus AGM EIA foi comparado com um antígeno *Aspergillus* GM EIA disponível comercialmente em um estudo externo usando amostras retrospectivas. Um total de 319 amostras (272 soros, 47 LBA) foram testados em ambos os ensaios. A análise dos dados foi realizada para determinar a porcentagem de concordância positiva e a porcentagem de concordância negativa. Os resultados dessa comparação são exibidos nas tabelas abaixo:

<u>Soro</u>		GM EIA	
		Pos.	Neg.
IMMY clarus AGM EIA	Pos.	32	1
	Neg.	13	226

<u>Soro</u>	Calculado	IC de 95%
% de concord. pos.	71,1%	56,6% a 82,3%
% de concord. neg.	99,6%	97,5% a 99,9%

<u>Fluido de LBA</u>		GM EIA	
		Pos.	Neg.
IMMY clarus AGM EIA	Pos.	16	1
	Neg.	3	27

<u>Fluido de LBA</u>	Calculado	IC de 95%
% de concord. pos.	84,2%	62,4% a 94,5%
% de concord. neg.	96,4%	82,3% a 99,4%

8. Desempenho clínico

Um estudo externo baseado nos critérios clínicos EORTC/MSG de 2020 para AI foi realizado para determinar a sensibilidade e especificidade do clarus AGM EIA avaliando 290 amostras retrospectivas (254 soro, 36 fluido de LBA) de pacientes em risco de AI. Os resultados dessa comparação são exibidos nas tabelas abaixo:

Soro		EORTC/MSG	
		Comprovado/ Provável	Sem AI
IMMY clarus	Pos.	32	0
Asp. GM EIA	Neg.	6	216

Soro	Calculado	IC de 95%
	Sensibilidade	84,2%
Especificidade	100,0%	98,3%-100%

Fluido de LBA		EORTC/MSG	
		Comprovado/ Provável	Sem AI
IMMY clarus	Pos.	14	1
Asp. GM EIA	Neg.	2	19

Fluido de LBA	Calculado	IC de 95%
	Sensibilidade	87,5%
Especificidade	95,0%	76,4%-99,1%














9. Procedimentos e materiais de referência

Não há procedimentos ou materiais de medição de referência disponíveis para o usuário.

SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

PROBLEMA	SOLUÇÃO
Resultados variáveis na réplica	<ul style="list-style-type: none"> Controles de configuração e amostras em uma placa de 96 poços separada, limpa e não revestida Use multicanal para pipetar da placa de 96 poços para os micropoços
Suspeita de contaminação de micropoços	<ul style="list-style-type: none"> Bata suavemente na placa para misturar os reagentes nos micropoços para evitar respingos Tome cuidado ao pipetar para garantir que não ocorram respingos ou transferências para micropoços vizinhos Troque as pontas entre os micropoços
ODs mais baixos do que o esperado (Reagentes muito frios)	<ul style="list-style-type: none"> Verifique e confirme se todos os reagentes estão entre 18 a 25 °C antes do teste

SÍMBOLOS

	Contém o suficiente para <n> testes		Número de catálogo/Número de referência
	Consulte as instruções de uso		Código de lote
	Fabricante		Para uso de diagnóstico in vitro
	Data de validade/Data de expiração		Limite de temperatura
	Controle positivo		Marca CE de conformidade
	Controle negativo		Representante autorizado na Comunidade Europeia/União Europeia
	Apenas para uso único		

BIBLIOGRAFIA

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 e 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. Apresentado em: 40th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; outubro 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, Rodriguez 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 U.S.A
 (405) 360-4669/(800) 654-3639
 Fax: (405) 364-1058
 E-mail: info@immy.com
 Site: www.immy.com



EC REP

MDSS

Schiffgraben 41

30175 Hannover, Germany