

PLATELIA™ ASPERGILLUS EIA

96 PRUEBAS

62796

**PLATELIA™ ASPERGILLUS EIA ES UNA DETERMINACIÓN
INMUNOENZIMÁTICA EN SÁNDWICH EN MICROPLACAS PARA LA
DETECCIÓN DEL ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILLUS
EN SUERO.**

IVD

BIO-RAD

1- USO PREVISTO

Platelia™ *Aspergillus* EIA es una determinación inmunoenzimática en sándwich en microplacas para la detección del antígeno galactomanano de *Aspergillus* en muestras de suero.

2- INDICACIONES DE USO

Platelia™ *Aspergillus* EIA es una prueba que facilita el diagnóstico de la aspergilosis invasiva cuando se utiliza junto a otros procedimientos diagnósticos como el cultivo microbiano, el estudio histológico de las muestras de biopsia y los datos radiológicos.

3- RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Las infecciones por *Aspergillus* aparecen habitualmente después de inhalar las esporas de *Aspergillus* que se encuentran en el medio ambiente. Las formas invasivas, que han ido en aumento en los últimos 10 años, constituyen las infecciones más graves. Aparecen principalmente en pacientes neutropénicos (después del tratamiento anticanceroso) y en pacientes tratados con inmunosupresores (trasplantados de órganos, en particular tras el trasplante de médula ósea) y corticosteroides ⁷.

Los *Aspergillus* raramente se aíslan en los hemocultivos. El diagnóstico se basa a menudo en signos diagnósticos o radiológicos inespecíficos (síntomas clínicos, TC, radiografía de tórax, etc.)

En este momento, la determinación del antígeno soluble galactomanano en suero se considera un método serológico que facilita el diagnóstico de la aspergilosis invasiva ^{6, 9, 14, 34, 39}.

4- PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO ²⁷

Platelia™ *Aspergillus* EIA es una determinación inmunoenzimática en sándwich en microplacas de un solo paso que detecta galactomanano en suero humano. En el método se utilizan anticuerpos monoclonales EBA-2 de rata, que se dirigen contra el galactomanano de *Aspergillus* y se han identificado en estudios previos ^{16, 28}. Se usan anticuerpos monoclonales (1) para recubrir los pocillos de la microplaca y unirse al antígeno y (2) para detectar el antígeno unido a la microplaca sensibilizada (reactivo conjugado: anticuerpos monoclonales ligados a peroxidasa). Las muestras de suero se tratan con calor en presencia de EDTA para disociar los complejos inmunes y precipitar las proteínas de suero que podrían interferir con la prueba ¹⁵. Las muestras de suero tratadas y el conjugado se añaden a los pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales y se incuban. Se formará un complejo anticuerpo monoclonal-galactomanano-anticuerpo monoclonal/peroxidasa en presencia del antígeno galactomanano.

Se lavan las tiras para eliminar el material que no haya reaccionado. A continuación, se añade la solución del sustrato, que reaccionará con los complejos ligados al pocillo para dar una reacción de color azul. La adición de ácido detiene la reacción enzimática y cambia el color azul por amarillo. La absorbancia (densidad óptica) de las muestras y controles se determina con un espectrofotómetro configurado con una longitud de onda de 450 y 620 nm.

5- REACTIVOS

Platelia™ *Aspergillus* EIA : N° de producto: 62796 (96 pruebas)

Almacenar el estuche a 2-8°C y dejarlos estabilizar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso. Todos los reactivos, excepto los controles, deben devolverse a temperatura de refrigeración de 2-8°C inmediatamente después de su uso. Después de su reconstitución, el control negativo, el control del valor umbral y el control positivo se deben congelar a -20°C. Las tiras o placas no usadas se deben reintroducir en sus bolsas, que se cerrarán. No retirar el secante. Las tiras deben utilizarse en las 5 semanas siguientes la apertura y resellado de la bolsa. Tras la dilución, la solución de lavado se puede conservar durante 14 días a 2-8°C. Todos los demás reactivos son estables hasta su fecha de caducidad después de su apertura. Los reactivos se suministran en cantidad suficiente para realizar 96 pruebas en un máximo de 9 lotes.

Componente		Contenido	Cantidad
R1	Microwell Strip Plate	Microplaca : - 96 pocillos (12 tiras de 8 pocillos cada una) recubiertos con anticuerpos monoclonales antigalactomanano	1 placa / 12 x 8 pocillos
R2	Concentrated Washing Solution	Solución lavado concentrada (10x): - Tampón tris NaCl - Tween® 20 al 1% - Timerosal al 0,01%	1 x 100 mL
R3	Negative Control Serum	Suero de control negativo: - Suero humano negativo para galactomanano, liofilizado - Negativo para anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-VHC	3 x cs* 1 mL
R4	Cut-off Control Serum	Suero de control del valor umbral: - Suero humano liofilizado que contiene galactomanano - Negativo para anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-VHC	3 x cs* 1mL
R5	Positive Control Serum	Suero de control positivo: - Suero humano liofilizado que contiene galactomanano - Negativo para anticuerpos anti-VIH-1, anti-VIH-2 y anti-VHC	3 x cs* 1 mL
R6	Conjugate	Conjugado (listo para usar): - Anticuerpo monoclonal de antigalactomanano marcado con peroxidasa - Conservante: timerosal al 0,01%	1 x 8 mL
R7	Serum Treatment Solution	Solución para tratamiento del suero (lista para usar): - Solución ácida de EDTA	1 x 10,5 mL
R8	TMB Substrate Buffer	Tampón de sustrato de TMB (listo para usar): - Solución de ácido cítrico y acetato sódico - Peróxido de hidrógeno al 0,009% - Dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%	1 x 60 mL
R9	Chromogen: TMB Solution	Solución de cromógeno de TMB (concentrada): - Solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 90% que contiene tetrametilbenzidina (TMB) al 0,6% [♦]	1 x 1 mL
R10	Stopping Solution	Solución de parada (lista para usar): - Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄) 1,5 N	1 x 12 mL
	Plate sealers	- Hojas adhesivas para microplacas	1 x 8 hojas

***Nota:** la TMB (tetrametilbenzidina) es un cromógeno de peroxidasa no carcinógeno y no mutágeno.

***Nota:** cs: Cantidad suficiente

6- ADVERTENCIAS PARA LOS USUARIOS

1. Para uso diagnóstico *in vitro*.
2. Sólo para uso profesional.
3. No se recomienda el uso de este kit de pruebas con muestras que no sean de suero humano.
4. El control positivo, el control de corte y el control negativo están fabricados a partir de suero humano que ha sido analizado con pruebas que llevan la marca "CE" y ha resultado no reactivo para HBs Ag y anticuerpos contra el VIH-1, el VIH-2 y el VHC. No obstante, deberán manejarse todos los reactivos como si pudieran transmitir infecciones. Todas las pruebas deberán realizarse de conformidad con la Norma Sobre Patógenos de Transmisión Sanguínea, bioseguridad de nivel 2 de la OSHA u otras prácticas de bioseguridad adecuadas.
5. Utilice ropa protectora, incluida una bata de laboratorio, protección para ojos/cara y guantes desechables (se recomiendan guantes sintéticos que no sean de látex), y manipule los reactivos del kit y las muestras de los pacientes aplicando las buenas prácticas de laboratorio necesarias. Lávese las manos a conciencia después de realizar la prueba.
6. No pipetee con la boca.
7. No fume, beba ni coma en zonas donde se estén manipulando muestras o reactivos del kit.
8. Evite las salpicaduras de muestras o de soluciones.
9. Los derrames biológicos que no contengan ácido deberán limpiarse a conciencia con un desinfectante eficaz. Entre otros, pueden usarse como desinfectantes una solución de lejía al 10 % (solución al 0,5 % de hipoclorito de sodio), etanol al 70 % o Wescodyne Plus™ al 0,5 %. Podría ser necesario desechar los materiales utilizados para limpiar los derrames como residuos biopeligrosos.

ATENCIÓN: No introduzca soluciones con lejía en la autoclave.

10. Los derrames que contengan ácido deberán ser absorbidos (secados) adecuadamente o neutralizados con bicarbonato sódico, y la zona deberá aclararse y secarse. Si el derrame contenía material biopeligroso, limpie la zona con uno de los desinfectantes químicos.
11. Deseche todas las muestras y materiales utilizados para realizar la prueba como si tuvieran un agente infeccioso. Los residuos químicos y biopeligrosos del laboratorio deberán manipularse y desecharse de conformidad con todas las normativas locales, regionales y nacionales.
12. **ATENCIÓN:** A continuación se detallan los posibles riesgos químicos incluidos en algunos componentes del kit (consulte la sección 5 REACTIVOS):



C-Corrosivo

La solución de interrupción con ácido sulfúrico 1,5 N (7,2 % de H₂SO₄) es corrosiva, puede provocar quemaduras en ojos y piel, puede ser nociva si se ingiere o en contacto con la piel y puede causar lesiones oculares graves, incluida discapacidad visual permanente o ceguera.

Manténgase alejado de bases fuertes y agentes reductores.

R34-41 Provoca quemaduras. Riesgo de lesiones oculares graves.

S24/25-26-30-36/37/39-60. Evítese el contacto con los ojos y la piel. En caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. No echar jamás agua al producto. Úsese indumentaria protectora, guantes y protección para los ojos/la cara adecuadas. Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

Los residuos de este material se consideran residuos ácidos peligrosos. No obstante, si lo permiten los requisitos aplicables, puede neutralizarse hasta un pH 6-9 para desecharlo como residuo no peligroso, si se tienen los conocimientos y medios para ello.

El timerosal (mertiolato sódico) al 0,01 %, un conservante biocida organomercurio dirigido al sistema nervioso central (SNC), es un tóxico reproductivo y un sensibilizador relevante. La exposición prolongada o repetida puede causar una reacción alérgica en personas sensibles. Existen numerosos casos de sensibilización como consecuencia de exposición a soluciones diluidas de Timerosal.

Evítese su liberación al medio ambiente: peligro de efectos acumulativos. Las soluciones utilizadas que contengan mercurio en una concentración superior a 0,2 ppm deberán desecharse según la normativa federal RCRA de EE.UU. sobre residuos peligrosos (D009); sin embargo, deseche todos los residuos de conformidad con todos los requisitos aplicables. (Nota: el mercurio (Hg) supone el 49,55 % de la molécula de Timerosal, por lo que un componente con 0,01 % de Timerosal contiene ~0,005 % (~50 ppm) de mercurio w/v.

En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con agua abundante. Advertencia: El Estado de California considera el Timerosal causante de toxicidad reproductiva.

13. Puede solicitarse la Hoja de datos de seguridad del material.

7- PRECAUCIONES DE EMPLEO

- 1. LAS MUESTRAS DE SUERO CONGELADO ALMACENADAS EN CONDICIONES DESCONOCIDAS PUEDEN DAR RESULTADOS FALSOS POSITIVOS POR CONTAMINACIÓN MICÓTICA O BACTERIANA.**
2. No usar el equipo de la prueba y ninguno de los reactivos después de la fecha de caducidad.
3. Excepto la solución de lavado concentrada (R2) y la solución de parada (R10), no mezclar los reactivos de otros estuches que tengan un número de lote diferente.
4. Estabilizar todos los reactivos a temperatura ambiente al menos 15 minutos antes de su uso.
5. Mezclar bien cuando se reconstituyan los reactivos, evitando la contaminación microbiana.
6. No realizar la prueba en presencia de reactivos que produzcan vapores (ácidos, alcalinos, aldehídos) o polvos que puedan alterar la actividad enzimática del conjugado.
7. Usar materiales de polipropileno desechables para preparar la solución de sustrato-cromógeno. Si se debe usar material de vidrio, debe limpiarse primero con ácido clorhídrico 1 N, aclararse a fondo con agua y secarse.
8. Para el pipeteado manual de los controles y las muestras, usar puntas de pipetas distintas en cada caso para evitar el arrastre de las muestras.
9. Para garantizar el lavado adecuado de los pocillos, respetar el número de ciclos de lavado prescrito y comprobar que todos los pocillos están completamente llenos, y después completamente vacíos. El lavado no debe hacerse manualmente con un frasco flexible.
10. No dejar secar la microplaca entre el final del ciclo de lavado y la adición de los reactivos.
11. No usar el mismo recipiente para el conjugado y para las soluciones de sustrato.
12. No dejar que el conjugado y las soluciones de sustrato-cromógeno entren en contacto con metales o iones metálicos.
13. Evitar la exposición del cromógeno o de la solución de sustrato-cromógeno a la luz fuerte durante el almacenamiento o la incubación. No dejar que el conjugado y las soluciones de sustrato-cromógeno entren en contacto con un producto oxidante.
14. Evitar el contacto de la solución de parada con un producto oxidante. No dejar que la solución de parada entre en contacto con metales o iones metálicos.
15. Usar materiales limpios y sin polvo (tubos, puntas, recipientes, etc.) para reducir al mínimo las posibilidades de contaminación con esporas de *Aspergillus* procedentes del entorno. Como el galactomanano es termoestable, la esterilización de los materiales usados no garantiza la ausencia de antígeno contaminante. El empleo de materiales apirógenos es óptimo pero se pueden usar materiales estándar con las precauciones adecuadas.
16. Limitar la exposición de las soluciones (suero, solución de tratamiento y conjugado) ni abrir los envases al aire (placas, tubos o pipetas).
17. No devolver el conjugado que no utilice al envase original.
18. La solución de sustrato-cromógeno debe ser incolora. La aparición de un color azul después de la dilución indica que el reactivo está contaminado y no se debe usar. Desecharlo y preparar reactivo nuevo.

8- PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

Placa de tiras de micropocillos (R1)

Las tiras de micropocillos se mantienen estables durante de 5 semanas después de abrir la bolsa que las contiene, cuando se conservan entre +2 y 8°C en el envase original bien cerrado y en presencia del secante que se adjunta.

Solución de lavado (R2)

Preparar la solución de lavado según necesidades, diluyendo 1 parte de la solución de lavado concentrada a 9 partes de agua ésteril destilada o desionizada. La solución de lavado se puede almacenar durante 14 días a 2–8°C. Preparar una cantidad suficiente de solución de lavado para completar la tanda de análisis (80 mL para una tira: 8 mL de R2 + 72 mL de agua destilada).

Después de su apertura, la solución de lavado concentrada es estable hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta cuando se almacena a +2–25°C en ausencia de contaminación.

Suero de control negativo (R3)

Reconstituir el contenido de un frasco de control con 1000 µL (1 mL) de agua ésteril purificada (preferiblemente, apirógena). Los sueros se deben rehidratar inmediatamente antes de realizar el análisis. Mezclar bien tras 2-3 minutos de rehidratación. Poner una alícuota de 300 µL en cada uno de los tubos de microcentrífuga de polipropileno. Congelar inmediatamente a -20°C los tubos de centrífuga de polipropileno que no se hayan usado tras la rehidratación.

Nota: Los sueros de control que se hayan rehidratado previamente y congelados inmediatamente a -20°C se puede volver a descongelar y usar sin rehidratar nuevamente. Los controles rehidratados congelados se pueden almacenar a -20°C durante un máximo de 5 semanas. Manipular los sueros de control como si fueran muestras de pacientes (300 µL de suero + 100 µL de la solución de tratamiento, etc.).

Suero de control del valor umbral (R4) y suero de control positivo (R5)

Preparar como se ha descrito anteriormente para el suero de control negativo.

Solución de sustrato-cromógeno (R8 + R9)

Preparar la solución de sustrato-cromógeno añadiendo una parte de solución concentrada del cromógeno TMB, R9, a 50 partes del tampón sustrato de TMB, R8. Preparar 2 mL de la solución de sustrato-cromógeno por tira: 40 µL de R9 + 2 mL de R8. La solución preparada es estable durante 6 horas cuando se almacena en la oscuridad a temperatura ambiente (+18-25°C).

Después de su apertura, los reactivos R8 y R9 almacenados a +2–8°C en ausencia de contaminación se mantienen estables hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta.

Conjugado (R6), solución de tratamiento del suero (R7) y solución de parada (R10)

Después de su apertura, los reactivos R6, R7 y R10 almacenados a +2–8°C en ausencia de contaminación se mantienen estables hasta la fecha de caducidad que se indica en la etiqueta.

9- OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Obtener las muestras de sangre según los procedimientos estándar del laboratorio. El ensayo se realiza con una muestra de suero. Las muestras de suero no deben estar contaminadas con esporas micóticas o con bacterias. Transportar y almacenar las muestras de suero en tubos sellados no expuestos al aire. Las muestras no abiertas se pueden almacenar a 2–8°C hasta 5 días antes del estudio. Después de la primera apertura, las muestras se pueden conservar a 2–8°C durante un máximo de 48 horas antes del estudio. Para un almacenamiento más prolongado, conservar el suero a -70°C.

Las muestras de suero pueden someterse a un máximo de 4 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras descongeladas deben mezclarse meticulosamente antes de la prueba.

Los resultados no se afectan en muestras que contienen 20 mg/L de bilirrubina, muestras lipémicas que contengan el equivalente a 2 g/L de trioleína (triglicérido) o muestras hemolizadas que contengan 165 mg/L de hemoglobina. No se han estudiado las interferencias relacionadas con el exceso de albúmina.

No quitar el complemento de los sueros.

10- PROCEDIMIENTO

Materiales proporcionados

Ver la sección REACTIVOS

Materiales necesarios pero no suministrados

1. Agua estéril destilada o desionizada, para diluir la solución de lavado.
2. Agua purificada para la reconstitución de los sueros de control.
3. Papel absorbente.
4. Guantes desechables.
5. Gafas protectoras.
6. Hipoclorito sódico (lejía) y bicarbonato sódico.
7. Pipetas o multipipetas ajustables o fijas para medir y aplicar 50 μL , 100 μL , 300 μL y 1000 μL .
8. Tubos de polipropileno para microcentrífuga de 1,5 mL con tapones herméticos que puedan soportar el calentamiento a 120°C (bloques de calor) o 100°C (baño de agua hirviendo).
 - a. Tubos con tapón de rosca: Tubos cónicos de 1,5 mL, N° de catálogo de Bio-Rad 224-0100 o equivalentes.
 - b. Tubos con tapón a presión: Tubos EZ Micro de 1,5 mL, N° de catálogo Bio-Rad 223-9480 o equivalente.
9. Tapones para tubos micro (N° de catálogo VWR 6054001 o equivalentes). Estos cierres sellan a presión los tubos, impidiendo que se abran durante los cambios de temperatura y presión y también permiten sacar más fácilmente los tubos del calentador de bloque o del baño de agua hirviendo.
10. Centrífuga de sobremesa de laboratorio para tubos de polipropileno 1,5mL, capaz de alcanzar 10.000 g.
11. Gradilla flotante para microcentrífuga.
12. Agitador vortex.
13. Bloque de calor. Se recomienda utilizar los siguientes bloques de calor:
 - a. Modelo de 1 bloque: N° de catálogo Grant QBD1 (N° de catálogo VWR # 460-0074)
 - b. Modelo de 2 bloques: N° de catálogo Grant QBD2 (N° de catálogo VWR # 460-0076)
14. Bloque para el bloque de calor: Ambos bloques de calor deben usarse con un bloque de Grant, N° de catálogo QB-E1 (N° de catálogo VWR 460-8517)
15. Baño de agua hirviendo ajustado a 100°C.
16. Incubadora para microplacas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
17. Sistema de lavado semiautomático o automático para microplacas.
18. Lector de microplacas con filtros de 450 nm y 620 nm.

Observaciones sobre el procedimiento

Para validar los resultados de la prueba se deben analizar en cada tanda un control negativo, un control positivo y los controles del valor umbral.

Tratamiento de los sueros

Todos los sueros de control: negativo (R3), del valor umbral (R4) y positivo (R5) deben procesarse al mismo tiempo que las muestras en estudio:

1. Pipetear 300 μL de cada muestra de suero y cada control en tubos de polipropileno de 1,5 mL.
2. Añadir 100 μL de solución de tratamiento del suero (R7) a cada tubo.
3. Mezclar bien los tubos agitando energicamente o usando el vortex. Cerrar bien el tubo para impedir que se abra durante el calentamiento; en caso de los tubos herméticos: usar un cierre para la tapa. No perforar el tapón.
4. **Opción de bloque térmico:**
Calentar los tubos durante 6 minutos en un bloque de calor a 120°C. Los tubos se deben introducir en el bloque sólo cuando se alcance la temperatura prescrita (*).

O BIEN

Opción de baño maría:

Si se usa el baño de agua hirviendo: calentar los tubos durante 3 minutos a 100°C. (*)

5. Extraer con cuidado los tubos calientes del bloque de calor o del agua hirviendo e introducirlos en una centrifuga. Centrifugar los tubos a 10.000 x g durante 10 minutos.
6. El sobrenadante se usa para la detección del antígeno galactomanano.
7. Estudiar los sobrenadantes con el siguiente procedimiento. Después de su preparación, el sobrenadante se puede extraer y almacenar a 2-8°C hasta 48 horas antes del estudio. Si los resultados indican que se debe repetir el análisis, se debe tratar otra alícuota de suero para su estudio.

(*) El cumplimiento estricto con la temperatura y el tiempo de espera prescritos y el uso del material recomendado son esenciales para el éxito del análisis. No se puede confiar en la temperatura que muestran los aparatos, hay que comprobar que cumple con las especificaciones usando un termómetro calibrado que se encajará en un tubo con aceite mineral: dentro del tubo se deben alcanzar los 120°C en el bloque de calor y los 100°C en un baño de agua hirviendo.

Procedimiento de EIA

Cumplir estrictamente con el protocolo propuesto.

Cumplir con las Buenas Prácticas de Laboratorio.

1. Estabilizar los reactivos a temperatura ambiente (18–25°C) al menos durante 15 minutos antes de su uso.
2. Preparar la solución de lavado, la solución de sustrato-cromógeno y los controles negativo, positivo y del punto de corte.
3. Preparar un diagrama para identificar los sueros y controles en estudio en cada microplaca. Usar un pocillo para el suero de control negativo (R3), dos pocillos para el suero de control del valor umbral (R4) y otro para el suero de control positivo (R5).
4. Extraer el soporte de la placa y las tiras de micropocillos (R1) de la bolsa de placas. Las tirillas no usadas deberán volver a la bolsa, con el secante, y se sellará inmediatamente.
5. Mezclar el contenido del frasco de conjugado (R6) invirtiéndolo antes de su uso. Añadir 50 µL de conjugado (R6) a cada pocillo. A continuación, añadir 50 µL del sobrenadante tratado del suero a cada pocillo, como se ha indicado anteriormente. No añadir las muestras de suero a los pocillos antes que el conjugado.
6. Cubrir la placa con su sellador, u otros medios que impidan la evaporación, y comprobar que toda la superficie está cubierta y hermética al agua.
7. Incubar la microplaca en un incubador seco de microplacas durante 90 ± 5 minutos a 37°C (± 1°C).
8. Retirar el sellador de la placa. Aspirar el contenido del pocillo hacia una botella de residuos (que contenga hipoclorito sódico). Lavar la placa 5 veces usando como mínimo 370 µL de la solución de lavado. Después del último lavado, invertir la placa y golpear suavemente sobre papel secante para garantizar que se elimina todo el líquido.
9. Añadir rápidamente 200 µL de la solución de sustrato-cromógeno (R8 + R9) a cada pocillo, evitando la exposición a la luz brillante.
10. Incubar la microplaca en la oscuridad a temperatura ambiente (18 a 25°C) durante 30 ± 5 minutos. **Durante este paso de incubación, no utilizar película adhesiva.**
11. Agregar 100 µl de la solución de parada (R10) a cada pocillo en el mismo orden en que se agregó la solución de sustrato. Mezclar bien.
12. Secar bien la base de la placa.
13. Leer la densidad óptica del cada pocillo a 450 nm (filtro de referencia de 620 nm). Las microplacas deberán leerse en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

11- CONTROL DE CALIDAD (CRITERIOS DE VALORACIÓN)

Control del valor umbral : La densidad óptica de cada suero de control del valor umbral debe ser $\geq 0,300$ y $\leq 0,800$

Control positivo : El índice del suero de control positivo debe ser mayor de 2,00

$$I = \frac{\text{DO Control positivo (R5)}}{\text{Media de la DO del control del valor umbral}} > 2,00$$

Control negativo : El índice del suero de control negativo debe ser menor de 0,40.

$$I = \frac{\text{DO Control negativo (R3)}}{\text{Media de la DO del control del valor umbral}} < 0,40$$

Si alguno de los controles no cumple los criterios de validez expuestos anteriormente, los resultados de la prueba no se considerarán válidos y los resultados del paciente no podrán comunicarse. El operario puede decidir repetir el análisis después de revisar el procedimiento, o puede solicitar la ayuda del fabricante. Si se repite el análisis, se deberá usar una nueva alícuota de la misma muestra.

Ejemplos del cálculo:

Muestra	Absorbancia (DO)
DO del control negativo (R3)	0,117
DO del control del valor umbral (R4)	0,596
	0,576
DO del control positivo (R5)	2,602

Cálculos

Media del control del valor umbral

Para calcular la media de la DO del control del valor umbral (R4), sumar los valores de DO de cada replicado del control del valor umbral y dividir el resultado por 2:

$$(0,596 + 0,576) \div 2 = 0,586$$

Índice del control negativo

Para calcular el índice del control negativo, dividir la DO del control negativo entre la media de la DO del control del valor umbral:

$$I = \frac{0,117}{0,586} = 0,20$$

Índice del control positivo

Para calcular el índice del control positivo, dividir la DO del control positivo entre la media de la DO del control del valor umbral:

$$I = \frac{2,602}{0,586} = 4,44$$

Validación

En el ejemplo anterior:

- La DO de cada control del valor umbral es $\geq 0,300$ y $\leq 0,800$, lo que indica que el control del valor umbral es válido.
- El índice del control negativo es $< 0,40$, lo que indica que el control negativo es válido.
- El índice del control positivo es $> 2,00$, lo que indica que el control positivo es válido.

El análisis de este ejemplo se considera válido porque cumple los criterios de validación de cada control.

12- INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La presencia o ausencia del antígeno galactomanano en la muestra en estudio se determina calculando un índice para cada muestra de pacientes. El índice (I) es la DO de la muestra dividida por la DO media de los pocillos que contienen el suero de control del valor umbral.

Cálculo de la densidad óptica media del control del valor umbral:

Sumar las densidades ópticas de los dos pocillos que contienen el suero de control del valor umbral (R4) y dividir por 2.

Cálculo de un índice (I) de cada suero en estudio:

Calcular la relación siguiente de cada suero en estudio:

$$I = \frac{\text{DO de la muestra}}{\text{Media de la DO del control del valor umbral}}$$

Los sueros con un índice < 0,50 se consideran negativos para el antígeno galactomanano.

Nota: Un resultado negativo indica que el resultado del paciente está por debajo del nivel detectable del análisis.

Nota: Los resultados negativos no descartan el diagnóstico de aspergilosis invasiva. Se recomienda repetir el estudio si el resultado es negativo, pero se sospecha que hay enfermedad.

Los sueros con un índice \geq 0,50 se consideran positivos para el antígeno galactomanano.

Para todos los pacientes positivos, se recomienda repetir la prueba con una nueva alícuota de la misma muestra, así como la toma de una nueva muestra del paciente para la realización de pruebas de seguimiento.

Nota: Un valor de absorbancia inferior a 0,000 puede indicar un error de procedimiento o instrumento que deberá ser evaluado. Ese resultado no es válido y deberá analizarse de nuevo la muestra.

Se recomienda la realización regular (dos veces por semana) de pruebas de detección a pacientes de alto riesgo para aumentar la sensibilidad de la prueba y obtener reacciones positivas lo antes posible.

Nota: La prueba Platelia™ *Aspergillus* EIA está pensada para ser usada como ayuda en el diagnóstico de la aspergilosis invasiva. Los resultados positivos obtenidos con Platelia™ *Aspergillus* EIA deberían tomarse en cuenta junto con otros procedimientos diagnósticos, tales como cultivo microbiológico, análisis histológico de muestras obtenidas mediante biopsia y pruebas radiográficas.

Ejemplos del cálculo:

Muestra	Absorbancia (DO)
DO del control negativo (R3)	0,117
DO del control del valor umbral (R4)	0,596
	0,576
DO del control positivo (R5)	2,602
Muestra del paciente N° 1	0,134
Muestra del paciente N° 2	0,436
Muestra del paciente N° 3	1,196

Cálculos

Consultar en la sección de Control de Calidad (Criterios de validación) un ejemplo del cálculo para determinar la validación de los controles del análisis.

Media del control del valor umbral

Para calcular la media de la DO del control del valor umbral (R4), sumar los valores de DO de cada replicado del control del valor umbral y dividir el resultado por 2:

$$(0,596 + 0,576) \div 2 = 0,586$$

Muestra del paciente N° 1

Para calcular el índice de la muestra del paciente N° 1, dividir la DO de la muestra del paciente N° 1 entre la media de la DO del control del valor umbral:

$$I = \frac{0,134}{0,586} = 0,23$$

En este ejemplo, la muestra del paciente N° 1 es negativa porque el índice 0,23 es < 0,50.

Muestra del paciente N° 2

Para calcular el índice de la muestra del paciente N° 2, dividir la DO de la muestra del paciente N° 2 entre la media de la DO del control del valor umbral:

$$I = \frac{0,436}{0,586} = 0,74$$

En este ejemplo, la muestra del paciente N° 2 es positiva porque el índice 0,74 es $\geq 0,50$.

Muestra del paciente N° 3

Para calcular el índice de la muestra del paciente N° 3, dividir la DO de la muestra del paciente N° 3 entre la media de la DO del control del valor umbral:

$$I = \frac{1,196}{0,586} = 2,04$$

En este ejemplo, la muestra del paciente N° 3 es positiva porque el índice 2,04 es $\geq 0,50$.

13- LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. **Un resultado negativo del análisis no descarta el diagnóstico de aspergilosis invasiva. Los pacientes en riesgo de aspergilosis invasiva se deben estudiar dos veces por semana.**
2. Cuando se estudie la presencia del antígeno galactomanano debe seguirse el procedimiento de Platelia™ *Aspergillus* EIA y la interpretación de los resultados. Se aconseja al usuario del estuche que lea detenidamente el folleto antes de realizar la prueba. En particular, debe seguirse el procedimiento de análisis al pipetear la muestra y los reactivos, lavar la placa y el momento de los pasos de incubación.
3. Si no se añade la muestra o el reactivo siguiendo las instrucciones del procedimiento se puede obtener un resultado falso negativo. **Se valorará repetir el estudio de nuevas muestras cuando se sospeche una aspergilosis invasiva clínica o un error de procedimiento.**
4. Se puede producir la contaminación de los pocillos de la muestra negativa del paciente por los pocillos de un control o una muestra positiva del paciente si el contenido de un pocillo se vierte sobre otro por una manipulación brusca de la microplaca o una mala técnica de pipeteado cuando se añadan los reactivos.
5. No se ha validado el rendimiento del Platelia™ *Aspergillus* EIA en muestras de pacientes neonatos o pediátricos.
6. La detección de galactomanano en pacientes con enfermedades granulomatosas crónicas (EGC) o síndrome de Job puede ser menor al usar el Platelia™ *Aspergillus* EIA ^{36,37}.
7. El uso concomitante de un tratamiento antimicótico activo en algunos pacientes con aspergilosis invasiva disminuye la sensibilidad del Platelia™ *Aspergillus* EIA ²⁰.
8. No se ha evaluado el uso del Platelia™ *Aspergillus* EIA con plasma u otras muestras como orina, LBA o LCR.
9. No se ha establecido el rendimiento del Platelia™ *Aspergillus* EIA en la lectura manual o la determinación visual de los resultados.
10. Otros géneros de hongos como los *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Geotrichum* e *Histoplasma* han mostrado reactividad con los anticuerpos monoclonales EBA-2 de rata usados en el ensayo para la detección del galactomanano del *Aspergillus*. Debería considerarse la posibilidad de que se tratara de una histoplasmosis en áreas endémicas, incluidas partes de Estados Unidos ^{22, 32, 38}.
11. **Reacción positiva sin signos clínicos:**
Teniendo en cuenta la detección precoz del antígeno galactomanano en suero, incluso antes de la aparición de las características clínicas o radiológicas, es habitual observar reacciones positivas sin signos clínicos: corresponden a análisis "verdaderos positivos" de pacientes en los que el diagnóstico de aspergilosis demostrada o probable se establecerá más adelante. Sin embargo, en algunos casos en particular se deberán tener en cuenta varios factores cuando se interprete la prueba:
 - a. Se han descrito reacciones positivas sin signos clínicos, especialmente en niños pequeños ²⁶. Aunque algunos de estos casos podrían estar relacionados con la circulación real de antígenos de *Aspergillus* ⁵, la mayoría se consideran falsos positivos.

- b. Se ha demostrado la presencia de galactofuranosa en algunos alimentos, en particular en cereales y derivados y en postres lácteos ^{1,17}. A diferencia de la leche materna, los leches humanizadas contienen concentraciones altas de galactomanano ¹⁰. Por tanto, se debe tener en cuenta el factor alimentario a la hora de interpretar la evolución de la antigenemia en los niños pequeños y también en aquellos casos con alteraciones de la barrera intestinal ^{4,10}. La interpretación de un caso de antigenemia positiva que no se acompañe de signos clínicos debe ser aún más cauta en esta población de pacientes ¹⁷.
- c. Se han publicado casos aislados de resultados positivos en el análisis del galactomanano en pacientes tratados con piperacilina / tazobactam. También se ha descrito que algunos lotes o series de piperacilina / tazobactam son positivos al antígeno galactomanano. Por tanto, los resultados positivos del análisis de los pacientes tratados con piperacilina / tazobactam deben interpretarse con cautela y confirmarse con otros métodos diagnósticos. También se ha descrito la detección de galactomanano en algunos lotes de preparados parenterales de amoxicilina con ácido clavulánico. Por tanto, cuando se interprete el resultado se tendrá en cuenta el tratamiento con un β-lactámico semisintético ^{1,21}. No obstante, no se puede descartar la aparición de una aspergilosis invasiva porque Platelia™ *Aspergillus* EIA detecta el antígeno galactomanano mucho antes de que aparezcan los signos clínicos o radiológicos. En consecuencia, se vigilará a los pacientes tratados con piperacilina / tazobactam y resultados positivos en el análisis.
- d. Podrían observarse reacciones positivas en ausencia de síntomas clínicos en pacientes que reciban por vía parenteral u oral (cuando exista una alteración de la barrera intestinal) productos que contengan galactomanano.

La presencia de galactomanano en dichos productos suele deberse al uso de un procedimiento de fermentación a partir de microorganismos fúngicos.

Sin embargo, sólo se observará un resultado positivo en el paciente si la concentración sérica de galactomanano exógeno alcanza o supera el umbral de detección de la prueba.

Así pues, cuando se produzca un resultado positivo y no existan otros síntomas, recomendamos investigar los productos que recibe el paciente, en especial su procedimiento de fabricación y el origen de las materias primas utilizadas ^{11,24-31}.

14- VALORES ESPERADOS

La prevalencia esperada de aspergilosis invasiva varía en cada población de pacientes; se han descrito tasas del 5–20% ^{7,13}.

Se realizó un estudio clínico con 4873 muestras de suero en total procedentes de 239 episodios (203 pacientes) con procesos malignos o trasplante de células germinales hematopoyéticas, diagnosticados y no diagnosticados de aspergilosis invasiva en dos centros de estudio en Europa para determinar las características del rendimiento del Platelia™ *Aspergillus* EIA.

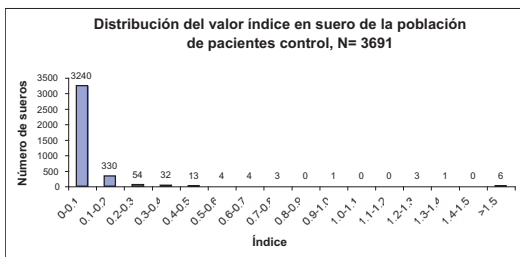
Como un paciente pudo haber sido incluido en el estudio en más de una ocasión, el análisis se realizó según cada episodio y tratamiento.

Se considera que un episodio es el periodo de tiempo que rodea un suceso clínico (p. ej., trasplante, GVHD, etc.), por lo que se puede haber observado más de un episodio en un único paciente.

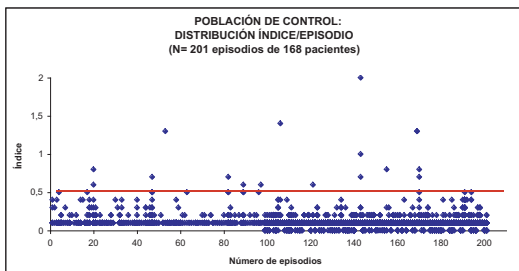
La tasa media de prevalencia de este estudio fue del 16% (38/239). En los diagramas siguientes se muestra la distribución de los valores índice de estas poblaciones.

Pacientes no diagnosticados de aspergilosis invasiva (población de control)

Se obtuvieron un total de 3691 muestras de 201 episodios (168 pacientes) en dos centros de estudio en Europa, que fueron estudiadas con el análisis Platelia™ *Aspergillus* EIA. En el diagrama siguiente se muestra la distribución de los valores índice.

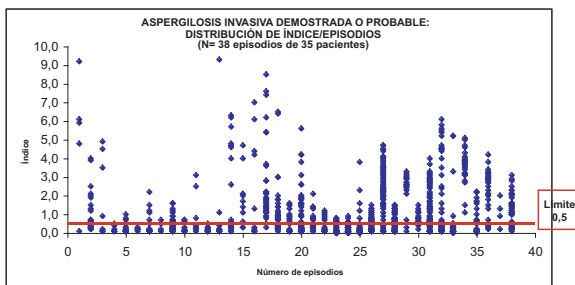


Este diagrama de dispersión muestra los resultados del análisis de galactomanano de las 3691 muestras de suero de 201 episodios (168 pacientes de control) en este estudio (pacientes sometidos a tratamiento inmunosupresor por TCGH, o para tratar un proceso maligno hematológico).



Pacientes diagnosticados de aspergilosis invasiva

Este diagrama de dispersión muestra los resultados del análisis de galactomanano de las 1182 muestras de suero de 38 episodios (35 pacientes) en este estudio diagnosticados de aspergilosis invasiva demostrada o probable, según definen la EORTC/NIAID.

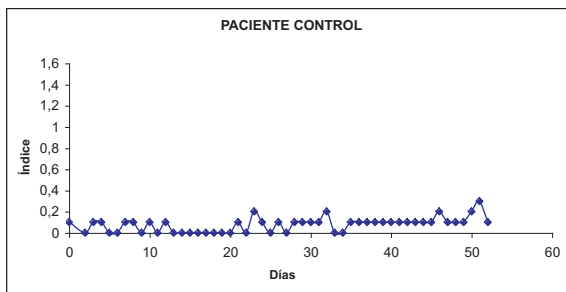


No se espera que todas las muestras de suero de cada paciente sean positivas.

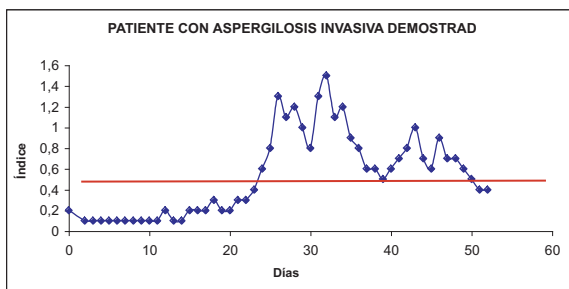
La prevalencia esperada de aspergilosis invasiva varía en cada población de pacientes; se han descrito tasas del 5–20%^{7,13}. La tasa de prevalencia en este estudio fue del 16%.

En los gráficos siguientes se muestran ejemplos de un paciente sin signos o síntomas clínicos de aspergilosis invasiva (negativo para *Aspergillus*) y otro con aspergilosis invasiva demostrada (positivo para *Aspergillus*), respectivamente.

Paciente negativo:



Paciente positivo :



15. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE RENDIMIENTO

A. Estudio de reproducibilidad

Se determinó la variabilidad interensayo e intraensayo del Platelia™ *Aspergillus* EIA en un estudio en el que se usó un panel de 6 muestras de sueros de pacientes combinados (uno negativo, uno positivo bajo, dos positivos y dos positivos altos) obtenidas en tres células centros de estudios clínicos en Norteamérica. Se sometieron a la prueba un total de 6 muestras por triplicado (x3) en 3 días diferentes, con un lote, en dos centros (número total de replicados en cada centro = 9).

Cada uno de los 6 miembros del panel se estudió por duplicado (x2) en tres días distintos, en un tercer centro (número total de replicados en el tercer centro = 6). Un (1) operario realizó todo el estudio de precisión en cada uno de los laboratorios.

Los datos se analizaron según los estándares del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). A continuación se muestran la media de la densidad óptica (DO) y la media del valor índice, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación porcentual (%CV), precisión intraserie (intraensayo) y precisión en los centros (interensayo) de cada miembro del panel en cada centro.

Centro 1	Miembro del panel	Neg.		Pos. bajo		Pos. #1		Pos. #2		Alto pos. #1		Alto pos. #2		Control neg.		Control CO		Control pos.			
		DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice
	N	0,052	0,09	0,445	0,74	0,702	1,17	0,931	1,563	1,227	2,06	2,887	4,83	0,046	0,08	0,006	1,00	2,216	3,67		
	Media	0,002	0,00	0,022	0,03	0,059	0,09	0,044	0,08	0,051	0,09	0,089	0,17	N/A	N/A	0,02	0,03	N/A	N/A		
	DE intraserie (intraensayo) ¹	N/A	N/A	4,8%	4,4%	8,4%	7,6%	4,7%	5,1%	4,2%	4,4%	3,1%	3,6%	N/A	N/A	3,7%	3,4%	N/A	N/A		
	%CV																				
	DE total (interensayo) ²	0,036	0,04	0,051	0,08	0,07	0,14	0,044	0,25	0,058	0,29	0,169	0,58	N/A	N/A	0,102	0,03	0,317	0,12		
	%CV	N/A	N/A	11,5%	10,4%	10,0%	11,6%	4,7%	15,7%	4,7%	14,3%	5,9%	11,9%	N/A	N/A	16,9%	2,8%	14,3%	3,3%		

Centro 2	Miembro del panel	Neg.		Pos. bajo		Pos. #1		Pos. #2		Alto pos. #1		Alto pos. #2		Control neg.		Control CO		Control pos.			
		DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice
	N	0,040	0,10	0,280	0,70	0,364	0,89	0,602	1,49	0,801	2,01	1,361	3,43	0,074	0,18	0,415	1,00	1,197	2,97		
	Media	0,006	0,01	0,041	0,09	0,023	0,07	0,045	0,11	0,046	0,10	0,047	0,11	N/A	N/A	0,00	0,01	N/A	N/A		
	DE intraserie (intraensayo) ¹	N/A	N/A	14,5%	13,0%	6,4%	7,6%	7,5%	7,1%	5,7%	4,8%	3,5%	3,2%	N/A	N/A	1,1%	1,1%	N/A	N/A		
	%CV																				
	DE total (interensayo) ²	0,006	0,03	0,058	0,19	0,083	0,18	0,057	0,28	0,042	0,53	0,079	1,00	N/A	N/A	0,094	0,01	0,068	0,54		
	%CV	N/A	N/A	20,8%	27,0%	22,7%	19,8%	9,5%	18,7%	5,3%	26,5%	5,8%	29,2%	N/A	N/A	22,7%	0,9%	5,7%	18,2%		

Centro 3	Miembro del panel	Neg.		Pos. bajo		Pos. #1		Pos. #2		Alto pos. #1		Alto pos. #2		Control neg.		Control CO		Control pos.			
		DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice	DO	Indice
	N	0,049	0,10	0,388	0,81	0,652	1,36	0,850	1,73	1,158	2,41	2,378	4,96	0,059	0,12	0,480	1,00	1,652	3,45		
	Media	0,003	0,01	0,009	0,02	0,062	0,17	0,068	0,14	0,094	0,20	0,126	0,25	N/A	N/A	0,028	0,06	N/A	N/A		
	DE intraserie (intraensayo) ¹	N/A	N/A	2,4%	2,4%	12,5%	12,2%	8,2%	8,2%	8,1%	8,2%	5,3%	5,1%	N/A	N/A	5,8%	5,8%	N/A	N/A		
	%CV																				
	DE total (interensayo) ²	0,012	0,03	0,078	0,13	0,068	0,15	0,104	0,25	0,082	0,15	0,111	0,34	N/A	N/A	0,028	0,04	0,056	0,23		
	%CV	N/A	N/A	20,0%	15,8%	10,5%	11,1%	12,5%	14,3%	7,1%	6,2%	4,7%	6,8%	N/A	N/A	5,8%	4,1%	3,4%	6,6%		

N/A = no aplicable

¹ NCCLS EP5-A, Vol. 19, N° 2, Pág. 24, Ecuación (C2)

² NCCLS EP5-A, Vol. 19, N° 2, Pág. 25, Ecuación (C3) y Ecuación (C4)

B. Reactividad cruzada

Se realizó un estudio para evaluar el efecto de las afecciones médicas no relacionadas con la aspergilosis invasiva y que pudieran interferir con la prueba, utilizando un lote del kit de Platelia™ *Aspergillus* EIA. Se estudiaron las reacciones cruzadas con el Platelia™ *Aspergillus* EIA las siguientes muestras de suero: Se estudiaron 151 sueros en total.

Patología	Nº de muestras estudiadas	Nº de positivos
Factor reumatoide	10	0
ANA positivo	10	0
Hipergammaglobulinemia de IgG	10	0
Hipergammaglobulinemia de IgM	10	0
Cáncer *	11	0
Cirrosis no víricas (biliar primaria; alcohólica o por fármacos)	10	0
Trasfusiones múltiples	10	0
Mujeres multiparas	10	0
VHA	10	0
VHC	10	0
Rubéola	10	0
CMV	10	0
Sífilis (RPR+)	10	0
Toxoplasmosis	10	0
Micoplasma	10	0

* Un caso de vejiga, mama (2), colon, endometrio, pulmón, próstata, renal y epidermoide (3).

C. Estudio clínico

Se realizó un estudio clínico para evaluar la sensibilidad, especificidad y valor predictivo del Platelia™ *Aspergillus* EIA en dos centros situados en Bélgica y los Países Bajos. El estudio se realizó retrospectivamente, usando un total de 4873 muestras de suero obtenidas en 203 pacientes de las siguientes poblaciones*:

- Pacientes sin signos de aspergilosis invasiva (pacientes de control)
- Pacientes con de aspergilosis invasiva probable
- Pacientes con de aspergilosis invasiva demostrada

* El IFICG (Invasive Fungal Infection Cooperative Group) de la EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) y el MSG (Mycosis Study Group) del NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) ha definido los criterios diagnósticos de la aspergilosis invasiva (AI) en pacientes con procesos malignos hematológicos o trasplante de células germinales hematopoyéticas ².

La aspergilosis invasiva demostrada se define por el cultivo microbiológico positivo obtenido por un procedimiento estéril en el lugar afectado y la demostración histopatológica de las formas morfológicas apropiadas en un huésped con síntomas atribuidos a la infección micótica.

La aspergilosis invasiva probable se define al menos por un criterio microbiológico y un criterio clínico mayor o dos menores en una localización compatible con la infección, en un huésped que tiene síntomas atribuidos a la infección micótica.

La aspergilosis invasiva posible se define al menos por un criterio microbiológico o un criterio clínico mayor o dos menores en una localización compatible con la infección, en un huésped que tiene síntomas atribuidos a la infección micótica.

Dada la escasez relativa de la aspergilosis invasiva probable y demostrada, ofrecemos a continuación una definición de la sensibilidad y especificidad clínicas utilizadas en este estudio.

SENSIBILIDAD

La sensibilidad se ha analizado con los resultados de este estudio. El estudio de sensibilidad se realizó usando la prueba de Platelia™ *Aspergillus* EIA en dos centros con un número total de 38 episodios de 35 pacientes trasplantados de médula ósea (TMO) y pacientes con leucemia diagnosticados de aspergilosis demostrada o invasiva probable.

1. Aspergilosis demostrada (definida según los criterios del IFICG / EORTC; ver más arriba)

Laboratorios combinados **N= 19 episodios en 16 pacientes**

Sensibilidad: 100% (19/19).

Nota: No se pudo calcular el intervalo de confianza al 95% por el tamaño insuficiente de la muestra.

2. Aspergilosis probable (definida según los criterios del IFICG / EORTC; ver más arriba)

Laboratorios combinados **N= 19 episodios en 19 pacientes**

Sensibilidad: 94,7% (18/19)

Nota: No se pudo calcular el intervalo de confianza al 95% por el tamaño insuficiente de la muestra.

3. Aspergilosis demostrada y probable combinadas (definidas según los criterios del IFICG / EORTC; ver más arriba)

Laboratorios combinados **N= 38 episodios en 35 pacientes**

Sensibilidad: 97,4% (37/38). El intervalo de confianza del 95% es del 86,2%-99,9%.

ESPECIFICIDAD

El estudio de especificidad se realizó usando la prueba de Platelia™ *Aspergillus* EIA en dos centros con un número total de 3691 combinadas obtenidas en 201 episodios (168 pacientes) sin signos de aspergilosis invasiva (pacientes de control).

Centro 1 : **N= 3060 muestras de 103 episodios (70 pacientes)**

Especificidad: 92,2% (95/103). El intervalo de confianza es 85,3%-96,6%.

Centro 2 **N= 631 muestras de 98 episodios (98 pacientes)**

Especificidad: 88,8% (87/98). El intervalo de confianza es del 80,8%-94,3%.

Centros combinados **N= 3691 muestras de 201 episodios (168 pacientes)**

Especificidad: 90,5% (182/201) El intervalo de confianza al 95% es de 85,6%-94,2%.

VALOR PREDICTIVO

Se han analizado los valores predictivos positivo y negativo (VPP y VPN) en la población de pacientes de este estudio, basados en la prevalencia actual del 16% observada en este estudio.

VPP: 66,1% (37/56)

VPN: 99,4% (182/183)

El análisis también se realizó teniendo en cuenta los resultados positivos cuando 2 muestras consecutivas tuvieron un índice mayor o igual a 0,5.

El rendimiento se resume en la tabla siguiente:

	Sensibilidad*	Especificidad	VPP	VPN
Centros combinados, teniendo en cuenta 1 muestra $\geq 0,5$	97,4% (37/38)	90,5% (182/201)	66,1% (37/56)	99,4% (182/183)
Centros combinados, teniendo en cuenta 2 muestras $\geq 0,5$	92,1% (35/38)	97,5% (196/201)	87,5% (35/40)	98,5% (196/199)

*: La sensibilidad se calculó con aspergilosis demostrada y probable.

16- CONTROL DE CALIDAD DEL FABRICANTE

Todos los reactivos fabricados se preparan según nuestro Sistema de Calidad, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización final del producto.

Cada lote de producto final se somete a un control de calidad y sólo se comercializa si está en conformidad con los criterios de aceptación predefinidos.

El fabricante conserva la documentación referente a la producción y al control de cada lote en Bio-Rad.

17-BIBLIOGRAPHY

1. **Ansorg, R., R. Van Den Boom, and P. M. Rath.** 1997. Detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in foods and antibiotics. *Mycoses* **40**: p. 353-7.
2. **Ascioglu, S., J. H. Rex, B. De Pauw, J. E. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D. W. Denning, J. P. Donnelly, J. E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J. F. Meis, T. F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P. M. Shah, D. A. Stevens and T. J. Walsh.** 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis.* **34**: p. 7-14.
3. **Aubry, A., R. Porcher, J. Bottero, S. Touratier, T. Leblanc, B. Brethon, P. Rousset, E. Raffoux, J. Menotti, F. Derouin, P. Ribaud and A. Sulahian.** 2006. Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus galactomannan* test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders. *J. Clin. Microbiol.* **44** (2): p. 389-94.
4. **Blijevens, N. M., J. P. Donnelly, J. F. Meis, P. E. Verweij, and B. E. De Pauw.** 2002. *Aspergillus galactomannan* antigen levels in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients given total parenteral nutrition. *Transpl. Infect. Dis.* **4**: p. 64-65.
5. **Chambon-Pautas, C., J. M. Costa, M. T. Chaumette, C. Cordonnier, and S. Bretagne.** 2001. Galactomannan and polymerase chain reaction for the diagnosis of primary digestive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia. *J. Infect.* **43**: p. 213-214.
6. **De Repentigny, L., L. Kaufman, G. T. Cole, D. Kruse, J. P. Latge, and R. C. Matthews.** 1994. Immunodiagnosis of Invasive Fungal Infections. *J. Med. Vet. Mycol.* **32**: p. 239-252.
7. **Denning, D. W.** 1998. Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **26**: p. 781-803.
8. **Dupont, B., M. Richardson, P. E. Verweij, and J. F. G. M. Meis.** 2000. Invasive Aspergillosis. *Medical Mycology* **38**: p. 215-224.
9. **Erjavec, Z. and P. E. Verweij.** 2002. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist. Updat.* **5**: p. 3-10.
10. **Gangneux, J. P., D. Lavarde, S. Bretagne, C. Guiguen, and V. Andemer.** 2002. Transient *Aspergillus* antigenaemia: think of milk. *Lancet* **359**: p. 1251.
11. **Hage, C. A., J. M. Reynolds, M. Durkin, L. J. Wheat, K. S. Knox.** 2007. Plasmalyte as a Cause of false-positive results for *Aspergillus galactomannan* in bronchoalveolar lavage fluid. *J. Clin. Microbiol.* **45**: p. 676-677.
12. **Herbrecht, R., V. Letscher-Bru, C. Oprea, B. Lioure, J. Waller, F. Campos, O. Villard, K. L. Liu, S. Natarajan-Ame, P. Lutz, P. Dufour, J. P. Bergerat, and E. Candolfi.** 2002. *Aspergillus galactomannan* detection in the diagnosis of Invasive Aspergillosis in cancer patients. *J. Clin. Oncol.* **20**: p. 1898-1906.
13. **Herbrecht, R., D. Denning, T. Patterson, J. Bennett, R. Greene, J. Oestmann, W. Kern, K. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R. Rubin, J. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P. Chandrasekar, M. Hodges, H. Schlamm, P. Troke, B. DePauw.** 2002. Voriconazole Versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* **347**, 6: p. 408-415.
14. **Latge, J. P.** 1995. Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Top. Med. Mycol.* **6**: p. 245-281.

15. **Latge, J. P.** 1999 *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin. Microbiol. Rev. **12**[2], 310-50.
16. **Latge, J. P., H. Kobayashi, J. P. Debeauvais, M. Diaquin, J. Sarfati, J. M. Wieruszkeski, E. Parra, J. P. Bouchara, and B. Fournet.** 1994. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. Infect. Immun. **62**: p. 5424-5433.
17. **Letscher-Bru, V., A. Cavalier, E. Pernot-Marino, H. Koenig, D. Eyer, J. Waller, and E. Candolfi.** 1998. Recherche d'antigène galactomannane aspergillaire circulant par Platelia™ *Aspergillus*: antigénémies positives persistantes en l'absence d'infection. J. Med. Mycol. **8**: p. 112-113.
18. **Maertens, J., J. Verhaegen, H. Demuynck, P. Brock, G. Verhoef, P. Vandenberghe, J. Van Eldere, L. Verbist, and M. Boogaerts.** 1999. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for Invasive Aspergillosis. J. Clin. Microbiol. **37**: p. 3223-3228.
19. **Maertens, J., J. Verhaegen, K. Lagrou, J. Van Eldere, and M. Boogaerts.** 2001. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for Invasive Aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. Blood **97**: p. 1604- 1610.
20. **Marr K. A., M. Laverdiere, A. Gugel and W. Leisenring.** 2005. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus galactomannan* enzyme immunoassay. Clin. Infect. Dis. **40**: p. 1762-9.
21. **Mattei, D., D. Rapezzi, N. Mordini, F. Cuda, C. Lo Nigro, M. Musso, A. Arnelli, S. Cagnassi, and A. Gallamini.** 2004. False-positive *Aspergillus galactomannan* enzyme-linked immunosorbent assay results in vivo during amoxicillin-clavulanic acid treatment. J. Clin. Microbiol. **42**: p. 5362-5363.
22. **Mennink-Kersten M. A. S. H., D. Ruegebrink, R. Klont, A. Warris, H. J. M. Op den Camp and P. Verweij.** 2005 Bifidobacterial Lipoglycan as a New Cause for False-Positive Platelia™ *Aspergillus* Enzyme Immunoabsorbent Assay Reactivity. J. Clin. Microbiol. **43**(8): p. 3925-3931.
23. **Nareddy, S., P. H. Chandrasekar.** 2008. False-positive *Aspergillus galactomannan* (GM) assay in histoplasmosis. J. Infection **56**: p. 80-81.
24. **Racil, Z., I. Kocmanova, M. Lengerova, J. Winterova, J. Mayer.** 2007. Intravenous PLASMA-LYTE as a Major Cause of False-Positive Results of Platelia™ *Aspergillus* EIA Test for Galactomannan Detection in Serum. J. Clin. Microbiol. **45**(2): p. 3141-3142
25. **Rimek, D., T. Zimmermann, M. Hartmann, C. Prariyachatigul, and R. Kappe.** 1999. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in Germany. Mycoses **42**: p. 25-8.
26. **Siemann, M., M. Koch-Dorfler, and M. Gaude.** 1998. False positive results in premature infants with the Platelia™ *Aspergillus* sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. Mycoses **41**: p. 373-7.
27. **Stynen, D., A. Goris, J. Sarfati, and J. P. Latge.** 1995. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with Invasive Aspergillosis. J. Clin. Microbiol. **33**: p. 497-500.
28. **Stynen, D., J. Sarfati, A. Goris, M. C. Prevost, M. Lesourd, H. Kamphuis, V. Darras, and J. P. Latge.** 1992. Rat monoclonal antibodies against *Aspergillus galactomannan*. Infect. Immun. **60**: p. 2237-2245.

29. **Sulahian, A., F. Boutboul, P. Ribaud, T. Leblanc, C. Lacroix, and F. Derouin.** 2001. Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of Invasive Aspergillosis in two adult and pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer* **91**: p. 311-318.
30. **Sulahian, A., M. Tabouret, P. Ribaud, J. Sarfati, E. Gluckman, J. P. Latge, and F. Derouin.** 1996. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**: p. 139-145.
31. **Surmont, J., W. Stockman.** 2007. Gluconate-containing intravenous solutions: Another cause of false-positive galactomannan assay reactivity. *J. Clin. Microbiol.* **45**: p. 1373.
32. **Swanink, C. M., J. F. Meis, A. J. Rijs, J. P. Donnelly, and P. E. Verweij.** 1997. Specificity of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Aspergillus galactomannan*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: p. 257-260.
33. **Verweij, P. E., E. C. Dompeling, J. P. Donnelly, A. V. Schattenberg, and J. F. Meis.** 1997. Serial monitoring of *Aspergillus* antigen in the early diagnosis of Invasive Aspergillosis. Preliminary investigations with two examples. *Infection* **25**: p. 86-89.
34. **Verweij, P. E. and J. F. Meis.** 2000. Microbiological diagnosis of Invasive Fungal Infections in transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.* **2**: p. 80-87.
35. **Verweij, P. E., D. Stynen, A. J. Rijs, B. E. de Pauw, J. A. Hoogkamp -Korstanje, and J. F. Meis.** 1995. Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing Invasive Aspergillosis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**: p. 1912-1914.
36. **Verweij, P. E., C. M. Weemaes, J. H. Curfs, S. Bretagne, J. F. Meis.** 2000. Failure to detect circulating *Aspergillus* markers in a patient with chronic granulomatous disease and Invasive Aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **38**: p. 3900-3901.
37. **Walsh T. J., R.L. Schaufele, T. Sein, J. Gea-Banacloche, M. Bishop, N. Young, R. Childs, J. Barrett, H. L. Malech, and S.M. Holland.** 2002. Reduced expression of *galactomannan antigenemia* in patients with Invasive Aspergillosis and chronic granulomatous disease or Job's syndrome. Abstracts of the 40th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America. Arlington, VA. P. 105 ; Abstr. 345.
38. **Wheat, L. J., E. Hackett, M. Durkin, P. Connolly, R. Petraitiene, T. J. Walsh, K. Knox, C. Hage.** 2007. Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the Bio-Rad Platelia™ *Aspergillus* enzyme immunoassay. *Clin. Vaccine Immunol.* **14** (5): p. 638-40.
39. **Yeo, S. F. and B. Wong.** 2002. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: p. 465-484.

CE

- (US) - CE marking (European directive 98/79/CE on *in vitro* diagnostic medical devices)
- (F) - Marquage CE (Directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*)
- (E) - Marcado CE (Directiva europea 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*)
- (I) - Marchiatura CE (Direttiva europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*)
- (D) - CE Konformitätskennzeichnung (Europäische Richtlinie 98/79/EG über *In-vitro*-Diagnostika)
- (P) - Marcação CE (Directiva europea 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in vitro*)
- (S) - CE-märkning (Europeiskt direktiv 98/79/EG om medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik)
- (DK) - CE-mærkningen (Europa direktiv 98/79/EF om medicinsk udstyr til *in vitro*-diagnostik)
- (GR) - Χαρακτηρισμός CE (ευρωπαϊκή οδηγία 98/79/CE περί *in vitro* διαγνωστικές ιατρικές συσκευές)
- (PL) - CE oznaczenie (Dyrektywa unijna 98/79/CE dotycząca produktów medycznych do badań *in vitro*)
- (LT) - CE ženklas (Europos sąjungos direktyva 98/79/CE dėl *in vitro* diagnostikos medicinos prietaisų)
- (H) - CE jelzés (Európai Irányelv az *in vitro* orvosi diagnosztikai eszközökről)
- (EST) - CE märgistus (Euroopa direktiiv 98/79/CE *in vitro* diagnostikameditsiiniiseadmete kohta)
- (SK) - CE označenie o zhode (Európska direktíva 98/79/CE pre *in vitro* diagnostické zdravotnícke postupy)
- (CZ) - CE značka (Evropská direktiva 98/79/CE o diagnostických zdravotnických prostředcích *in vitro*)
- (N) - CE-merking (EU-direktiv 98/79/CE om medisinsk utstyr til *in vitro*-diagnostikk)
- (RO) - Marca CE (Directiva europeana 98/79/CE pentru dispozitive medicale de diagnostic *in vitro*)
- (BG) - CE маркировка (Европейска директива 98/79/CE за ин vitro диагностичните медицински изделия)

IVD

- (US) - For *in vitro* diagnostic use
- (F) - Pour diagnostic *in vitro*
- (E) - Para diagnóstico *in vitro*
- (I) - Per uso diagnostico *in vitro*
- (D) - In-vitro-Diagnostikum
- (P) - Para uso em diagnóstico *in vitro*
- (S) - *In vitro*-diagnostik
- (DK) - *In vitro* diagnose
- (GR) - Για *in vitro* διαγνωστική χρήση
- (PL) - Do stosowania *in vitro*
- (LT) - *in vitro* diagnostikai
- (H) - Csak *in vitro* diagnosztikai alkalmazásra
- (EST) - *In vitro* diagnostiliseks kasutamiseks
- (SK) - Na diagnostiku *in vitro*
- (CZ) - Pro diagnostiku *in vitro*
- (N) - Til *in vitro*-diagnostikk
- (RO) - Pentru diagnostic *in vitro*
- (BG) - За ин vitro диагностика

REF

- (US) - Catalogue number
- (F) - Référence catalogue
- (E) - Número de catálogo
- (I) - Numero di catalogo
- (D) - Bestellnummer
- (P) - Número de catálogo
- (S) - Katalognummer
- (DK) - Katalognummer
- (GR) - Αριθμός καταλόγου
- (PL) - Numer katalogu
- (LT) - Katalogo numeris
- (H) - Cikkszám
- (EST) - Katalooginumber
- (SK) - Katalógové číslo
- (CZ) - Katalogové číslo
- (N) - Katalognummer
- (RO) - Număr de catalog
- (BG) - Каталоген номер

**EC REP**

- (US) - Manufacturer
- (F) - Fabricant
- (E) - Fabricante
- (I) - Produttore
- (D) - Hersteller
- (P) - Fabricante
- (S) - Tillverkad av
- (DK) - Fremstillet af
- (GR) - Κατασκευαστής
- (PL) - Producent
- (LT) - Gamintojas
- (H) - Gyártó
- (EST) - Tootja
- (SK) - Výrobca
- (CZ) - Výrobce
- (N) - Produzent
- (RO) - Producător
- (BG) - Производител

- (US) - Authorised Representative
- (F) - Représentant agréé
- (E) - Representante autorizado
- (I) - Distributore autorizzato
- (D) - Bevollmächtigter
- (P) - Representante Autorizado
- (S) - Auktoriserad representant
- (DK) - Autoriseret repræsentant
- (GR) - Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος
- (PL) - Upoważniony Przedstawiciel
- (LT) - Įgaliotasis atstovas
- (H) - Meghatalmazott Képviselő
- (EST) - Volitatud esindaja
- (SK) - Autorizovaný zástupca
- (CZ) - Zplnomocněný zástupce
- (N) - Autorisert representant
- (RO) - Reprezentant autorizat
- (BG) - Упълномощен представител

LOT

- (US) - Batch code
- (F) - Code du lot
- (E) - Código de lote
- (I) - Codice del lotto
- (D) - Chargen-Bezeichnung
- (P) - Código do lote
- (S) - Batchnr
- (DK) - Batchkoden
- (GR) - Κωδικός παρτίδας
- (PL) - Numer serii
- (LT) - Serijos numeris
- (H) - Gyártási szám
- (EST) - Partii kood
- (SK) - Číslo šarže
- (CZ) - Číslo šarže
- (N) - Partikode
- (RO) - Număr de lot
- (BG) - Партиден номер



- (US) - Expiry date YYYY/MM/DD
- (F) - Date de péremption AAAA/MM/JJ
- (E) - Estable hasta AAAA/MM/DD
- (I) - Da utilizzare prima del AAAA/MM/GG
- (D) - Verwendbar bis JJJJ/MM/TT
- (P) - Data de expiração AAAA/MM/DD
- (S) - Utgångsdatum ÅÅÅÅ/MM/DD
- (DK) - Aendes for ÅÅÅÅ/MM/DD
- (GR) - Ημερομηνία λήξης YYYY/MM/DD
- (PL) - Data ważności YYYY/MM/DD
- (LT) - Galioja iki YYYY/MM/DD
- (H) - Szavatossági idő ÉÉÉÉ/HH/NN
- (EST) - Aegumistähtaeg AAAA/KK/PP
- (SK) - Použiteľné do RRRR/MM/DD
- (CZ) - Datum expirace RRRR/MM/DD
- (N) - Utløpsdato ÅÅÅÅ/MM/DD
- (RO) - Data expirării AAAA/LL/ZZ
- (BG) - Срок на годност година/месец/ден



- (US) - Storage temperature limitation
(F) - Limites de températures de stockage
(E) - Temperatura límite
(I) - Limiti di temperatura di conservazione
(D) - Lagertemperatur
(P) - Limites de temperatura de armazenamento
(S) - Temperaturbegränsning
(DK) - Temperaturbegränsning
(GR) - Περιορισμός θερμοκρασίας αποθήκευσης
(PL) - Temperatura przechowywania
(LT) - Saugojimo temperatūriniai apribojimai
(H) - Tárolási hőmérsékleti határok
(EST) - Püirangud säilitustemperatuurile
(SK) - Skladovacia teplota od do
(CZ) - Teplotní rozmezí od do
(N) - Oppbevaringstemperatur
(RO) - Limitele de temperatură la stocare
(BG) - Температурни граници на съхранение



- (US) - Consult Instruction for use
(F) - Consulter le mode d'emploi
(E) - Consultare las instrucciones de uso
(I) - Consultare le istruzioni per uso
(D) - Siehe Gebrauchsanweisung
(P) - Consulte o folheto informativo
(S) - Se bruksanvisningen
(DK) - Se instruktion for brug
(GR) - Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης
(PL) - Sprawdź instrukcję
(LT) - Ieškote informacijos vartojimo instrukcijoje
(H) - Olvassa el a használati utasítást
(EST) - Kasutamisel vaata instruksiooni
(SK) - Katalógové číslo
(CZ) - Viz návod k použití
(N) - Se bruksanvisninger
(RO) - Consultați prospectul de utilizare
(BG) - Виж инструкцията за употреба

- (US) - The other languages which are required in conformity to the European Directive can be obtained from your local Bio-Rad agent.
- (F) - Les autres langues requises par la Directive Européenne sont disponibles auprès de votre représentant Bio-Rad local.
- (E) - Los otros idiomas que se requieren para la conformidad de la Directiva Europea puede ser obtenida en su oficina local Bio-Rad.
- (I) - Le altre lingue che sono richieste in conformità con le Direttive Europee possono essere ottenute dal locale agente Bio-Rad.
- (D) - Die anderen Sprachen, die in Übereinstimmung mit der europäischen IVD Direktive benötigt werden, erhalten Sie über Ihre lokale Bio-Rad Niederlassung.
- (P) - As restantes línguas, obrigatórias em conformidade com a Directiva Europeia, podem ser obtidas através da subsidiária Bio-Rad mais próxima de si.
- (S) - Övriga språk som krävs i enlighet med EG-direktivet kan erhållas från din lokala Bio-Rad-representant.
- (DK) - De øvrige sprog som kræves i henhold til EU direktiv kan fås ved henvendelse til den lokale Bio-Rad leverandør.
- (GR) - Τις υπολοίπες γλώσσες που απαιτούνται για συμμόρφωση στην ευρωπαϊκή οδηγία μπορείτε να τις προμηθευθείτε από τον τοπικό σας αντιπροσωπο Bio-Rad.
- (PL) - Tłumaczenie w innych językach które są wymagane w Dyrektywie Unijnej może być otrzymane od lokalnego przedstawiciela firmy Bio-Rad.
- (LT) - Vertimus, reikalingus pagal Europos sąjungos direktyvos reikalavimus, į kitas kalbas galite gauti iš vietinio Bio-Rad atstovo.
- (H) - A leírás az Európai Irányelv által előírt egyéb nyelveken hozzáférhető a Bio-Rad helyi kirendeltségénél.
- (EST) - Teised vastavalet Euroopa Direktiivile nõutavad keeled on saadaval kohaliku Bio-Radi edasimõõija käest.
- (SK) - Ostatné jazykové verzie, ktoré sú vyžadované v zhode s Európskou direktívou, možno obdržať od vášho lokálneho zástupcu Bio-Rad.
- (CZ) - Další jazykové verze vyžadované ve shodě s evropskou direktivou jsou k dispozici u lokálního zastoupení firmy Bio-Rad.
- (N) - Øvrige språk som kreves i henhold til EU-direktivet, fås fra din lokale Bio-Rad-representant.
- (RO) - Alte traduceri cerute in conformitate cu Directiva Europeana se pot obtine de la Rezentanta Bio-Rad locala.
- (BG) - Останалите езици, които се изискват съгласно Европейската Директива, могат да Ви бъдат предоставени от локалния представител на Био-Рад.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette France

Tel. : +33 (0) 1 47 95 60 00

Fax.: +33 (0) 1 47 41 91 33



03/2009

code: 881045