

ELI.H.A *Aspergillus*

Prueba de aspergilosis serológica por hemaglutinación indirecta

102 Pruebas

(Ref. 44602)

8000110-ES-2025-02

Para uso en diagnóstico *in vitro*, sólo para uso profesional.

Pruebas de un solo uso.



1 - USO

ELI.H.A *Aspergillus* permite la determinación cuantitativa de anticuerpos séricos *anti-Aspergillus fumigatus* por hemaglutinación indirecta.

Con cada kit se pueden realizar 102 pruebas o 17 reacciones con 6 diluciones.

2 - INTRODUCCIÓN

Aspergillus fumigatus es la especie más comúnmente incriminada en patología humana.

A. fumigatus tiene una capacidad especial para la adaptación parasitaria a los seres humanos. Sin embargo, para su desarrollo se requieren ciertas condiciones favorables:

- condiciones locales (cupulae preformadas, abscesos pulmonares degenerados, membranas mucosas dañadas...);
- condiciones generales (inmunosupresión después de procedimientos quirúrgicos o médicos importantes: trasplante de órganos, terapia inmunosupresora, esteroides, antibióticos...).

3 - PRINCIPIO DE PRUEBA

ELI.H.A *Aspergillus* se basa en el principio de la hemaglutinación indirecta. Los glóbulos rojos sensibilizados consisten en glóbulos rojos de ovejas recubiertas con antígeno *Aspergillus fumigatus*.

La presencia de anticuerpos séricos específicos conduce a la aglutinación de los eritrocitos sensibilizados, lo que produce una capa marrón rojiza turbia en la depresión. En ausencia de anticuerpos específicos, los glóbulos rojos forman un depósito anular en el fondo de la depresión. Los eritrocitos no sensibilizados garantizan la especificidad de la reacción, por lo que se puede descartar cualquier perturbación causada por las aglutininas naturales contra las ovejas (heteroanticuerpos Forssman, anticuerpos infecciosos contra la mononucleosis...).

La reacción se lleva a cabo en una placa de microtitulación en U.

El manejo es sencillo y rápido, los resultados se obtienen en 2 horas.

4 - REACTIVOS Y MATERIALES

Descripción	Cantidad
R1: Tubo con 2,2 mL de glóbulos rojos sensibilizados	1
R2: Tubo que contiene 1 mL de glóbulos rojos no sensibilizados	1
BUF: vial con 55 mL de solución tampón de fosfato, pH 7,2	1
R3: Tubo con 2 mL de adsorbente	1
CONTROL +: Tubo con 0,2 mL de control positivo titulado	1
CONTROL -: Tubo con 0,2 mL de control negativo	1
MICROPLACA: Placas de microtitulación (en forma de U)	2
DROPPER: Cuentagotas especial	2

5 - ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Solo para el diagnóstico *in vitro* y para la realización de pruebas por personal de laboratorio cualificado.

- Pruebas de un solo uso.

- Todos los reactivos, excepto el reactivo **BUF**, contienen materias primas de origen animal. saltos y deben manejarse con precaución.

- Las muestras de pacientes son potencialmente infecciosas. Deben manipularse con precaución, respetando las normas de higiene y las normativas vigentes para este tipo de productos en el país de uso.

- Los reactivos contienen azida sódica (< 0.1%).

- No utilizar reactivos después de la fecha de caducidad.

- No utilice reactivos de diferentes lotes.

- Los reactivos deberán haber alcanzado la temperatura ambiente antes de su uso.

- Agitar suavemente los reactivos **R1** y **R2** antes de su uso.

- Cuando se dispensan los reactivos **R1** y **R2**, asegúrese de que el cuentagotas esté perfectamente vertical. Asegúrese de que las gotas estén libres de burbujas de aire, ya que solo entonces se garantiza un volumen constante.

6 - MUESTREO Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Utilizar suero fresco o conservado a -20°C que no muestre signos de hemólisis, turbidez o contaminación.

Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas.

No realice ningún tratamiento térmico previo (descomposición) del suero.

7 - ESTABILIDAD, ALMACENAJE Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los reactivos están listos para su uso.

Todos los reactivos, almacenados en el embalaje original a 2-8 °C, se conservarán hasta la fecha de caducidad indicada en el envase. El producto no debe congelarse.

8 - MATERIALES NECESARIOS (no incluidos en el kit)

- Pipeta(s) automática (s) con un volumen de pipeteo adaptado al volumen que se va a medir;
- Contenedores para residuos contaminados;
- Centrífuga;
- Tubos hemolíticos.

9 - REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

Antes de su uso en la prueba, todos los reactivos y muestras deben haber alcanzado la temperatura ambiente.

9.1 - Preparación de la muestra

Realizar una dilución 1: 40 del suero a analizar:

- 50 µL de suero;
- 1,95 mL del reactivo **BUF**.

9.2 - Realización de la prueba en una microplaca

- Pipetear con una micropipeta multicanal en 8 cúpulas de la placa de microtitulación 50 µL **BUF**.

- Añadir 50 µL de suero diluido con una micropipeta a la primera cúpula. Mezclar el suero con el reactivo **BUF** y realizar una serie de diluciones transfiriendo 50 µL de la primera cúpula a la segunda, luego 50 µL de la segunda a la tercera y así sucesivamente hasta la sexta cúpula. A continuación, retire 50 µL de la sexta cúpula y deséchelo. De esta manera, en las cúpulas 1 a 6 se obtienen diluciones de 1:80 a 1:2560.

- Pipetear a la séptima cúpula 50 µL de dilución de suero 1 : 40. Mezclar con el tampón **BUF** y retirar 50 µL y desechar. Esta dilución 1:80 representa el control del suero y se utiliza para detectar las aglutininas naturales anti ovejas que pueden estar presentes en algunos sueros.

- Agitar con cuidado **R1** y **R2**.
 - Añadir 1 gota de **R1** en cada uno de las primeras 6 cúpulas.
 - En la séptima cúpula, añadir 1 gota de **R2** (control sérico).
 - Añadir 1 gota de **R1** a la octava cúpula (control del reactivo). Esto sirve para el control de exactitud del reactivo **BUF** y **R1**.

Nota: Solo se debe realizar un control de reactivo por serie de ensayo.

- Homogeneizar cuidadosamente el contenido de las cúpulas:

- ya sea manualmente golpeando los bordes de la placa de microlitros lateralmente
 - o con un agitador vibratorio para placas de microtitulación (por ejemplo, a 1300 rpm durante 10 s). No utilice agitadores con movimientos circulares (orbitales, agitadores circulares).
- No mueva la placa y déjela libre de vibraciones.

- 2 horas más tarde, leer el resultado de la reacción.

9.3 - Adsorción de aglutininas naturales anti ovinas en caso de aglutinación del control sérico

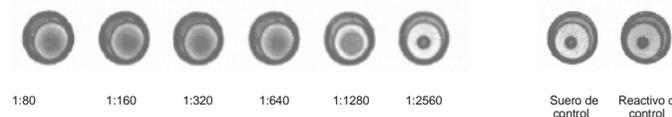
- **R3** - Agitar suavemente el reactivo.
- Poner lo siguiente en un tubo y mezclar:
 - 0,1 mL de suero
 - 0,3 mL **R3**
- Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 15 minutos.
- Disminuir el sobrenadante líquido; el suero se diluye ahora 1:4.
- Realizar una dilución 1:10 del sobrenadante en el reactivo **BUF** para obtener una dilución madre adsorbida (1:40).
- Siga los pasos descritos en "Realización de la prueba en una microplaca", pero sustituya la dilución madre dilución madre por la dilución madre adsorbida

10 - OBSERVACIÓN / LECTURA DE LA REACCIÓN

Reacción negativa: Ausencia de hemaglutinación. En el fondo de la depresión se puede ver un anillo más o menos ancho.

Reacción positiva: Presencia de hemaglutinación. Presencia de una capa marrón rojiza en el fondo de la cúpula; a veces también se muestra un anillo periférico delgado.

Ejemplo de hemaglutinación obtenida con un suero positivo 1:1280:



11 - INTERPRETACION DES RESULTADOS

Título < 1:320: Reacción no significativa. Probablemente no haya aspergilosis invasiva. Repita la prueba después de 2 a 3 semanas y, además, realice una electroforesis de contracorriente o una electroforesis inmune.

Título = 1:320: Reacción ambigua. Repetir la prueba después de 2 a 3 semanas y, además, realizar una electroforesis de contracorriente o una electroforesis inmune

Título ≥ 1:640: La respuesta significativa indica aspergilosis invasiva.

12 - CONTROL DE CALIDAD INTERNO

CONTROL + y **CONTROL -** deben tratarse como muestras de pacientes. El título del reactivo **CONTROL +** debe coincidir con el título ± una dilución impreso en la etiqueta del vial. **CONTROL -** no debe tener hemaglutinación. Si hay hemaglutinación, la prueba no es válida.

13 - CAUSAS DE LOS ERRORES Y LIMITACIONES DEL MÉTODO

- Mala conservación del suero.
- Mala conservación de los reactivos después de abrirlos.
- Utilice solo los cuentagotas incluidos en el kit.
- Los cuentagotas no deben intercambiarse entre los reactivos **R1** y **R2**.
- En caso de reacción positiva en las primeras 6 cúpulas, se realizará otra serie de diluciones para determinar el límite del título de la hemaglutinación.
- El control del suero debe mostrar una reacción negativa (anillo). En caso de hemaglutinación de este control, la prueba debe repetirse después de que se hayan eliminado las aglutininas naturales contra las ovejas del suero por adsorción.
- El control del reactivo debe mostrar una reacción negativa (anillo). En caso de hemaglutinación de este control, no se puede utilizar ELI.H.A *Aspergillus*.
- Los sueros, cuya concentración de anticuerpos es muy alta, en las primeras diluciones pueden causar un fenómeno de zona (con la desaparición de la turbidez), que desaparece nuevamente en las diluciones posteriores.
- La calidad de los reactivos permite realizar la reacción por la noche y leer la prueba a la mañana siguiente, siempre que la placa de microtitulación no se mueva de ninguna manera y esté protegida de los golpes.
- En todos los casos, los datos clínicos, epidemiológicos y biológicos deben tenerse plenamente en cuenta antes de establecer el diagnóstico final.

14 - EFICACIA

ELI.H.A *Aspergillus* se compone de glóbulos rojos sensibilizados al antígeno *Aspergillus fumigatus*, que garantiza la especificidad y sensibilidad de la reacción de hemaglutinación indirecta. Los resultados de las evaluaciones de prueba muestran una sensibilidad del 80% y una especificidad del 98%.

15 - ELIMINACIÓN DE RESIDUOS

Los residuos deben eliminarse en el país de uso de conformidad con las normas de higiene y las normas aplicables a este tipo de productos. Si se derrama el reactivo **BUF**, limpie el área de trabajo con papel absorbente y enjuague con agua. Si se derrama un suero u otro reactivo en el área de trabajo, límpiolo con lejía y papel absorbente.

16 - LITERATURA

1. J. CAPDEVILLE, S. FIABANE - Diagnostic immunologique des aspergilloses - *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XII, N° 121, 205-249.
2. B. PESSON, N. LEGER, G. MADULO-LEBLOND - Diagnostic immunologique en parasitologie et en mycologie *Le Pharmacien Biologiste*, Tome XIII, N° 123, 417-455.
3. J.-M. SENET, C. BRISSET - The diagnosis of aspergillosis by passive haemagglutination - *Biomedicine*, 1973, 19, 365-368.
4. J.-M. SENET, R. ROBERT, E. PICHOT - Intérêt de l'hémagglutination indirecte dans le diagnos précoce de l'aspergillose - *Bulletin de la Société de Mycologie Médicale*, 1974, Tome III, N° 1, 45-48.
5. J.-M. SENET, R. ROBERT - Intérêt de l'hémagglutination dans le diagnostic de maladies parasitaires. Application à la toxoplasmosis et à l'aspergillose - *Archives Médicales de l'Ouest*, 1979, Tome 11, N° 1, 39-42.
6. A. CULINO, M. MIEGEVILLE, O. MORIN - Apports de l'hémagglutination indirecte dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire - *Feuillets de Biologie*, 1984, Vol. XXV, N°137, 51/57.
7. M. MIEGEVILLE, O. MORIN, C. VERMEIL - Etude sérologique rétrospective concernant une série d'aspergillose chez des malades à "hauts risques" - *Feuillets de Biologie*, 1986, Vol. XXVII, N° 148, 37-39.
8. M.-C. GBADAMASSI, C. CIVADIER, T. SANDRE, T.-H. DUONG, C. COMBESCOT - Diagnostic immunologique de l'aspergillose : Proposition de l'association de deux techniques facilement mises en œuvre au laboratoire - *Feuillets de Biologie*, 1989, Vol. XXX, N°169, 31-34.

Los cambios desde la revisión anterior, están resaltados en gris.

ELITech MICROBIO

Parc d'activités du Plateau

Allée d'Athènes

83870 SIGNES

FRANCE

☎: 33 (0)4 94 88 55 00

🌐: <http://www.elitechgroup.com>

