

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Aspergillus fumigatus IgM ELISA



DEASPM0680



96



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

CONTENTS / CONTENIDO

1. INTRODUCTION	3
2. INTENDED USE	3
3. PRINCIPLE OF THE ASSAY	3
4. MATERIALS	4
5. STABILITY AND STORAGE	4
6. REAGENT PREPARATION	5
7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION	5
8. ASSAY PROCEDURE.....	6
9. RESULTS	7
10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE.....	8
12. PRECAUTIONS AND WARNINGS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. USO PREVISTO.....	10
3. PRINCIPIO DEL ENSAYO	10
4. MATERIALES.....	11
5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE.....	11
6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS	12
7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	12
8. PROCEDIMIENTO	13
9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS.....	14
10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO.....	15
11. LIMITACIONES DEL ENSAYO	15
12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS	16
BIBLIOGRAPHY	17
ABBREVIATIONS.....	17
SUMMARY OF TEST PROCEDURE.....	18
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

1. INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus is a fungus of the genus *Aspergillus*, and is one of the most common *Aspergillus* species to cause disease in individuals with an immunodeficiency. *A. fumigatus*, a saprotroph widespread in nature, is typically found in soil and decaying organic matter. Colonies of the fungus produce thousands of small conidia (2-3 µm) that readily become airborne. The fungus is capable of growth at temperatures up to 50 °C, with conidia surviving at 70 °C. Humans are continuously in contact with these asexual spores and it is estimated that an individual inhales several hundred conidia each day; typically these are quickly eliminated by the immune system. Aspergillosis develops mainly in individuals who are immunocompromised, either from disease or from immunosuppressive drugs, and is a leading cause of death in acute leukemia and hematopoietic stem cell transplantation. The term aspergillosis comprises a number of different diseases caused by fungi of the genus *Aspergillus*. The most common forms are allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), pulmonary aspergilloma and invasive aspergillosis (IA). Allergic bronchopulmonary aspergillosis is characterized by an exaggerated response of the immune system to *Aspergillus* species. It occurs in patients suffering from asthma or cystic fibrosis. Clinically, ABPA manifests as a bronchial asthma with transient pulmonary infiltrates that may proceed to proximal bronchiectasis and lung fibrosis. Aspergilloma, commonly referred to as “fungus ball,” occurs in preexisting pulmonary cavities that were caused by tuberculosis, sarcoidosis, or other bullous lung disorders. The fungus settles in a cavity and grows until it forms a compact sphere, which incorporates dead tissue from the surrounding lung, mucus, and other debris. Patients are usually asymptomatic and often co-exist for decades with aspergillomae prior to incidental diagnosis. However, it may cause hemoptysis. Invasive aspergillosis is a rapidly progressive, often fatal disease, targeting severely immunocompromised patients, including those with hematological malignancies such as leukemia, those who have received solid organ or hematopoietic stem cell transplants, and individuals with chronic granulomatous disease or advanced AIDS. IA is characterized by invasion of blood vessels, resulting in multifocal infiltrates. Dissemination to other organs, particularly the central nervous system, may occur.

Species	Disease	Symptoms (e.g.)	Transmission route
<i>Aspergillus fumigatus</i>	allergic bronchopulmonary aspergillosis aspergilloma invasive aspergillosis	wheezing, blood/brownish plugs in sputum, fever often asymptomatic; hemoptysis may occur variable and nonspecific: fever, chest pain, cough, malaise, weight loss, dyspnoea	Inhalation of fungus spores

Infection or presence of pathogen may be identified by:

- Culture and histopathology of tissue samples
- PCR
- Chest radiographs
- Serology: e.g. ELISA

2. INTENDED USE

The *Aspergillus fumigatus* IgM ELISA is intended for the qualitative determination of IgM class antibodies against *Aspergillus fumigatus* in human serum or plasma (citrate, heparin).

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative immunoenzymatic determination of specific antibodies is based on the ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique. Microtiterplates are coated with specific antigens to bind corresponding antibodies of the sample. After washing the wells to remove all unbound sample material a horseradish peroxidase (HRP) labelled conjugate is added. This conjugate binds to the captured antibodies. In a second washing step unbound conjugate is removed. The immune complex formed by the bound conjugate is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is proportional to the amount of specific antibodies in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

1. **SORB MIT Microtiterplate:** 12 break -apart 8-well snap-off strips coated with Aspergillus fumigatus antigens; in resealable aluminium foil.
2. **SAM DIL IgM Sample Dilution Buffer:** 1 bottle containing 100 mL of phosphate buffer (10 mM) for sample dilution; pH 7.2 ± 0.2 ; anti-human IgG (RF Absorbent); coloured green; ready to use; white cap; $\leq 0.0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
3. **STOP SOLN Stop Solution:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
4. **WASH SOLN 20x Washing Buffer (20x conc.):** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2 , for washing the wells; white cap.
5. **ENZ CONJ Conjugate:** 1 bottle containing 20 mL of peroxidase labelled antibody to human IgM in phosphate buffer (10 mM); coloured red; ready to use; black cap.
6. **SUB TMB TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), $< 0.1\%$; ready to use; yellow cap.
7. **CAL C Positive Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; red cap; $\leq 0.02\%$ (v/v) MIT.
8. **CAL B Cut-off Control:** 1 vial containing 3 mL control; coloured yellow; ready to use; green cap; $\leq 0.02\%$ (v/v) MIT.
9. **CAL A Negative Control:** 1 vial containing 2 mL control; coloured yellow; ready to use; blue cap; $\leq 0.0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Controls are calibrated in arbitrary units against internal quality control specimens, since no international standard reference is available for this assay.

For hazard and precautionary statements see 12.1

For potential hazardous substances please check the safety data sheet.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instruction for use (IFU)
- 1 Plate layout

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 10 and 1000 μL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with Aspergillus fumigatus antigens. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

6.2. Washing Buffer (20x conc.)

Dilute Washing Buffer 1 + 19; e. g. 10 mL Washing Buffer + 190 mL distilled water. The diluted buffer is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g. in a water bath. Mix well before dilution.

6.3. TMB Substrate Solution

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

7. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7.1. Sample Dilution

Before assaying, all samples should be diluted 1+100 with IgM Sample Dilution Buffer. Dispense 10 µL sample and 1 mL IgM Sample Dilution Buffer into tubes to obtain a 1+100 dilution and thoroughly mix with a Vortex.

8. ASSAY PROCEDURE

Please read the instruction for use carefully before performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instruction for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the washing steps from three up to five and the volume of Washing Buffer from 300 μ L to 350 μ L to avoid washing effects. Pay attention to chapter 12. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Perform all assay steps in the order given and without any delays.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard/control and sample.

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 100 μ L standards/controls and diluted samples into their respective wells. Leave well A1 for the Substrate Blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 1 hour \pm 5 min at 37 ± 1 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 μ L of Washing Buffer. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!
Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.
5. Dispense 100 μ L Conjugate into all wells except for the Substrate Blank well A1.
6. **Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C).** Do not expose to direct sunlight.
7. Repeat step 4.
8. Dispense 100 μ L TMB Substrate Solution into all wells.
9. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
10. Dispense 100 μ L Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
11. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the Stop Solution.

8.1. Measurement

Adjust the ELISA Microtiterplate reader to **zero** using the **Substrate Blank**.

If - due to technical reasons - the ELISA Microtiterplate reader cannot be adjusted to zero using the Substrate Blank, subtract its absorbance value from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard/control and sample in the plate layout. Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended. **Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.**

9. RESULTS

9.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Substrate Blank:** Absorbance value < **0.100**
- **Negative Control:** Absorbance value < **0.200** and < **Cut-off**
- **Cut-off Control:** Absorbance value **0.150 – 1.300**
- **Positive Control:** Absorbance value > **Cut-off**

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

9.2. Calculation of Results

The Cut-off is the mean absorbance value of the Cut-off Control determinations.

Example: Absorbance value Cut-off Control 0.44 + absorbance value Cut-off control 0.42 = 0.86 / 2 = 0.43
Cut-off = 0.43

9.2.1. Results in Units [U]

$$\frac{\text{Sample (mean) absorbance value} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{Units} = \text{U}]$$

Example:
$$\frac{1.591 \times 10}{0.43} = 37 \text{ U (Units)}$$

9.3. Interpretation of Results

Cut-off	10 U	-
Positive	> 11 U	Antibodies against the pathogen are present. There has been a contact with the antigen (pathogen resp. vaccine).
Equivocal	9 – 11 U	Antibodies against the pathogen could not be detected clearly. It is recommended to repeat the test with a fresh sample in 2 to 4 weeks. If the result is equivocal again the sample is judged as negative .
Negative	< 9 U	The sample contains no antibodies against the pathogen. A previous contact with the antigen (pathogen resp. vaccine) is unlikely.
Diagnosis of an infectious disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as serological data. In immunocompromised patients and newborns serological data only have restricted value.		

9.3.1. Antibody Isotypes and State of Infection

Serology	Significance
IgM	Characteristic of the primary antibody response High IgM titer with low IgG titer: → suggests a current or very recent infection Rare: → persisting IgM
IgG	Characteristic of the secondary antibody response May persist for several years High IgG titer with low IgM titer: → may indicate a past infection

10. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications. For further information about the specific performance characteristics please contact Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Precision

Intraassay	n	Mean (OD)	CV (%)
#1	24	0.436	2.65
#2	24	0.645	3.63
#3	24	1.203	1.83

Interassay	n	Mean (U)	CV (%)
#1	12	15.51	5.76
#2	12	31.75	7.55
#3	12	6.61	6.19

10.2. Diagnostic Specificity

The diagnostic specificity is defined as the probability of the assay of scoring negative in the absence of the specific analyte.

It is 100% (95% confidence interval: 89.11% - 100%).

10.3. Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity is defined as the probability of the assay of scoring positive in the presence of the specific analyte.

It is 90.91% (95% confidence interval: 58.72% - 99.77%).

10.4. Interferences

Interferences with hemolytic, lipemic or icteric samples are not observed up to a concentration of 10 mg/mL hemoglobin, 5 mg/mL triglycerides and 0.5 mg/mL bilirubin.

10.5. Cross Reactivity

Investigation of a sample panel with antibody activities to potentially cross-reacting parameters (rheumatoid factors and antibodies to *Candida albicans*) did not reveal evidence of false-positive results due to cross-reactions.

11. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H317	May cause an allergic skin reaction.
P261	Avoid breathing spray.
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/ attention.
P362+P364	Take off contaminated and Wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

12.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

1. INTRODUCCIÓN

Aspergillus fumigatus es un hongo del género Aspergillus, y es una de las especies de Aspergillus más comunes responsables de causar enfermedades en pacientes con una inmunodeficiencia.

A. fumigatus, un saprófito extendido en la naturaleza, se encuentra normalmente en el suelo y materia orgánica en descomposición. Las colonias del hongo producen miles de pequeños conidios (2-3 µm) que fácilmente se distribuyen en el aire. El hongo es capaz de crecer a temperaturas de hasta 50 °C, los conidios sobreviven a 70 °C. Los seres humanos están continuamente en contacto con estas esporas asexuales y se estima que una persona inhala varios cientos de conidios cada día; normalmente, estos son eliminados rápidamente por el sistema inmune.

La aspergilosis se desarrolla principalmente en pacientes inmunocomprometidos, ya sea por enfermedad o por fármacos inmunosupresores, y es una de las causas principales de muerte en la leucemia aguda y trasplante de células madre hematopoyéticas.

El término aspergilosis comprende un abundante número de distintas enfermedades causadas por los hongos del género Aspergillus. Las formas más comunes son la aspergilosis alérgica broncopulmonar (ABPA), aspergiloma pulmonar y la aspergilosis invasiva (AI).

La aspergilosis alérgica broncopulmonar está caracterizada por una respuesta exagerada del sistema inmune a las especies de Aspergillus. Se produce en pacientes que sufren asma o fibrosis quística. Clínicamente, la ABPA se manifiesta como un asma bronquial con infiltrados pulmonares transitorios que pueden preceder a bronquiectasias y fibrosis pulmonar.

Aspergiloma, comúnmente conocida como "bola de hongo", se produce en las cavidades pulmonares preexistentes que fueron causadas por la tuberculosis, la sarcoidosis u otros trastornos pulmonares cavernosos. El hongo se asienta en una cavidad y crece hasta que se forma una esfera compacta, que incorpora el tejido muerto del pulmón circundante, moco y otros desechos. Los pacientes suelen ser asintomáticos y a menudo coexisten durante décadas con aspergilomas anteriores diagnosticados accidentalmente. Sin embargo, puede causar hemoptisis.

La aspergilosis invasiva es una enfermedad rápidamente progresiva, a menudo mortal, con una especial preferencia por pacientes severamente inmunocomprometidos, incluyendo aquellos con neoplasias hematológicas como la leucemia, los que han recibido trasplantes de órganos o de células madre hematopoyéticas, y los individuos con enfermedad granulomatosa crónica o SIDA. La IA se caracteriza por la invasión de los vasos sanguíneos, dando lugar a infiltrados multifocales. Puede producirse diseminación a otros órganos, en particular al sistema nervioso central.

Especie	Enfermedad	Síntomas (p. ej.)	Vía de transmisión
Aspergillus fumigatus	Aspergilosis alérgica broncopulmonar Aspergiloma aspergilosis invasiva	sibilancias, sangre/tapones de color marrón en el esputo, fiebre a menudo asintomática; puede producirse hemoptisis variables e inespecífico: fiebre, dolor de pecho, tos, malestar general, pérdida de peso, disnea	Inhalación de esporas de hongos

La infección o la presencia de un patógeno puede identificarse mediante:

- Cultivo e histopatología de las muestras de tejido
- PCR
- Radiografía de tórax:
- Serología: p.ej. ELISA

2. USO PREVISTO

El ensayo de inmunoenzima Aspergillus fumigatus IgM ELISA se utiliza para la determinación cualitativa de anticuerpos IgM específicos contra Aspergillus fumigatus en suero o plasma (citrato, heparina) humano.

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación inmunoenzimática cualitativa de anticuerpos específicos se basa en la técnica ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. Después de lavar los pocillos para eliminar todo el material de muestra no unida, el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP) se añade. Este conjugado se une a los anticuerpos capturados. En una segunda etapa de lavado se retira el conjugado no unido. El complejo inmune formado por el conjugado unido se visualiza añadiendo substrato tetrametilbencidina (TMB), que da un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos en la muestra. se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

1. **SORB** **MT** **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertos con antígenos de *Aspergillus fumigatus* en bolsa de aluminio.
2. **SAM** **DIL** **Tampón de Dilución de Muestras IgM:** 1 botella de 100 mL de solución de tampón de fosfato (10 mM) para diluir la muestra; pH $7,2 \pm 0,2$; anti-humana IgG (RF Absorbente); color verde; listo para ser utilizado; tapa blanca; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
3. **STOP** **SOLN** **Solución de Parada:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
4. **WASH** **SOLN** **20x** **Tampón de Lavado (20x conc.):** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH $7,2 \pm 0,2$; tapa blanca.
5. **ENZ** **CONJ** **Conjugado:** 1 botella de 20 mL de conjugado de anticuerpos IgM anti-humano con peroxidasa en tampón de fosfato (10 mM); color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado.
6. **SUB** **TMB** **Solución de Sustrato de TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzindina (TMB), $< 0,1\%$; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
7. **CAL** **C** **Control Positivo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa roja; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
8. **CAL** **B** **Control Cut-off:** 1 botella de 3 mL control; color amarillo; tapa verde; listo para ser utilizado; $\leq 0,02\%$ (v/v) MIT.
9. **CAL** **A** **Control Negativo:** 1 botella de 2 mL control; color amarillo; tapa azul; listo para ser utilizado; $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 12.1.

Para sustancias potencialmente peligrosas por favor revise la ficha de datos de seguridad.

4.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso
- 1 esquema de la placa

4.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático para Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (10-1000 μ L)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C.

6. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con antígenos de *Aspergillus fumigatus*. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

6.2. Tampón de Lavado (20x conc.)

Diluir el Tampón de Lavado 1+19; por ejemplo 10 mL del Tampón de Lavado + 190 mL de agua destilada. El Tampón de Lavado diluido es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

6.3. Solución de Sustrato de TMB

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. La solución debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si el sustrato se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

7. TOMA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7.1. Dilución de las muestras

Antes del ensayo, las muestras tienen que estar diluidas en relación 1 + 100 con el Tampón de Dilución de Muestras IgM, p. e. 10 µL de la muestra con 1 mL de Tampón de Dilución de Muestras IgM, mezclar bien con la mezcladora Vortex.

8. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el número de lavados de tres hasta cinco veces y el volumen de Tampón de Lavado de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 12. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (se recomienda determinar en duplicado) en el esquema de la placa suministrada. Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipetear 100 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos. Dejar el pocillo A1 para el blanco.
2. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
3. **Incubar 1 h \pm 5 min a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.**
4. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla tres veces con 300 µL del Tampón de Lavado. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
5. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo con excepción del blanco substrato A1.
6. **Incubar 30 min a la temperatura ambiente ($20...25^\circ\text{C}$).** Evitar la luz solar directa.
7. Repetir el lavado como en el paso numero 4.
8. Pipetear 100 µL de Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
9. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente ($20...25^\circ\text{C}$).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
10. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
11. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.

8.1. Medición

Ajustar el fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA al cero utilizando el Blanco.

Si por razones técnicas el fotómetro de Placa de Microtitulación de ELISA no se puede ajustar a cero utilizando el Blanco, el valor de la absorbancia de este debe ser sustraído de los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados fiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras en el esquema de la placa.

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

9. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

9.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Blanco:** valor de la extinción < **0,100**
- **Control Negativo:** valor de la extinción < **0,200 y < Cut-off**
- **Control Cut-off:** valor de la extinción **0,150 – 1,300**
- **Control Positivo:** valor de la extinción > **Cut-off**

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

9.2. Cálculo del valor de la medición

El Cut-off se obtiene de los valores de la extinción de los dos controles cut-off.

Ejemplo: 0,42 OD Control Cut-off + 0,44 OD Control Cut-off = 0,86:2 = 0,43

Cut-off = 0,43

9.2.1. Resultados en unidades [U]

$\frac{\text{Promedio de la extinción de la muestra} \times 10}{\text{Cut-off}} = [\text{unidades} = \text{U}]$

Ejemplo: $\frac{1,591 \times 10}{0,43} = 37 \text{ U}$

9.3. Interpretación de los resultados

Cut-off	10 U	-
Positivo	> 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno están presentes. Ha producido un contacto con el antígeno (patógeno resp. vacuna).
Zona intermedia	9 – 11 U	Los anticuerpos contra el patógeno no se pudieron detectar claramente. Se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado es de nuevo en la zona intermedia, la muestra se considera como negativa .
Negativo	< 9 U	La muestra no contiene anticuerpos contra el patógeno. Un contacto previo con el antígeno (patógeno resp. vacuna) es poco probable.
El diagnóstico de una infección no solamente se debe basar en el resultado del ensayo. Es necesario considerar la anamnesis y la sintomatología del paciente junto al resultado serológico. Estos resultados sólo tienen valor restringido en pacientes inmunodeprimidos o en neonatos.		

9.3.1. Isotipos de anticuerpo y Estado de la Infección

Serología	Significado
IgM	Característica de la respuesta primaria del anticuerpo Alto título de IgM con bajo título de IgG → sugieren una infección muy reciente o aguda Raras: → persistente IgM
IgG	Característica de la respuesta secundaria del anticuerpo Pueden persistir por varios años El alto título de IgG con bajo título de IgM: → pueden indicar una infección pasada

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

Para obtener más información sobre las características del ensayo, por favor, entre en contacto Demeditec Diagnostics GmbH.

10.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
#1	24	0,436	2,65
#2	24	0,645	3,63
#3	24	1,203	1,83

Inter ensayo	n	Promedio (U)	CV (%)
#1	12	15,51	5,76
#2	12	31,75	7,55
#3	12	6,61	6,19

10.2. Especificidad diagnóstica

La especificidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado negativo en ausencia del analítico específico. Es 100% (95% Intervalo de confianza: 89,11% - 100%).

10.3. Sensibilidad de diagnóstico

La sensibilidad del ensayo se define como la probabilidad que tiene el ensayo de dar un resultado positivo en presencia del analítico específico. Es 90,91% (95% Intervalo de confianza: 58,72% - 99,77%).

10.4. Interferencias

Las muestras lipémicas, ictericas e hemolíticas no mostraron interferencias con este equipo ELISA hasta una concentración de 5 mg/mL para triglicéridos, de 0,5 mg/mL para bilirrubina y de 10 mg/mL hemoglobina.

10.5. Reacción cruzada

Pruebas realizadas con un panel de muestras con distinta actividad de anticuerpos para estudiar parámetros de reactividad (factores reumatoides y anticuerpos contra *Candida albicans*) no dieron falsos positivos debidos a reactividad cruzada.

11. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnóstico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

12.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación esta sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

BIBLIOGRAPHY

1. American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases (2009): Red Book. Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed. Elk Grove Village, IL.
2. Cramer, Robert A.; Rivera, Amariliz; Hohl, Tobias M. (2011): Immune responses against *Aspergillus fumigatus*: what have we learned? In *Current opinion in infectious diseases* 24 (4), pp. 315–322. DOI: 10.1097/QCO.0b013e328348b159.
3. Dagenais, Taylor R. T.; Keller, Nancy P. (2009): Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. In *Clinical Microbiology Reviews* 22 (3), pp. 447–465. DOI: 10.1128/CMR.00055-08.
4. Kurup, Viswanath P.; Kumar, Anooa (1991): Immunodiagnosis of aspergillosis. In *Clinical Microbiology Reviews* 4 (4), pp. 439–456. DOI: 10.1128/CMR.4.4.439.
5. Latgé, Jean-Paul (1999): *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. In *Clinical Microbiology Reviews* 12 (2), pp. 310–350.
6. Stevens, David A.; Kan, Virginia L.; Judson, Marc A.; Morrison, Vicky A.; Dummer, Stephen; Denning, David W. et al. (2000): Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. In *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 30 (4), pp. 696–709. DOI: 10.1086/313756.

ABBREVIATIONS

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one









SUMMARY OF TEST PROCEDURE**SCHEME OF THE ASSAY**
Aspergillus fumigatus IgM ELISA**Test Preparation**

<p>Prepare reagents and samples as described. Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls on the plate layout supplied in the kit. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.</p>
--

Assay Procedure

	Substrate Blank (A1)	Negative Control	Cut-off Control	Positive Control	Sample (diluted 1+100)
Negative Control	-	100 µL	-	-	-
Cut-off Control	-	-	100 µL	-	-
Positive Control	-	-	-	100 µL	-
Sample (diluted 1+100)	-	-	-	-	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
Conjugate	-	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 30 min at room temperature (20...25 °C) Do not expose to direct sunlight Wash each well three times with 300 µL of Washing Buffer					
TMB Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark					
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)					

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta