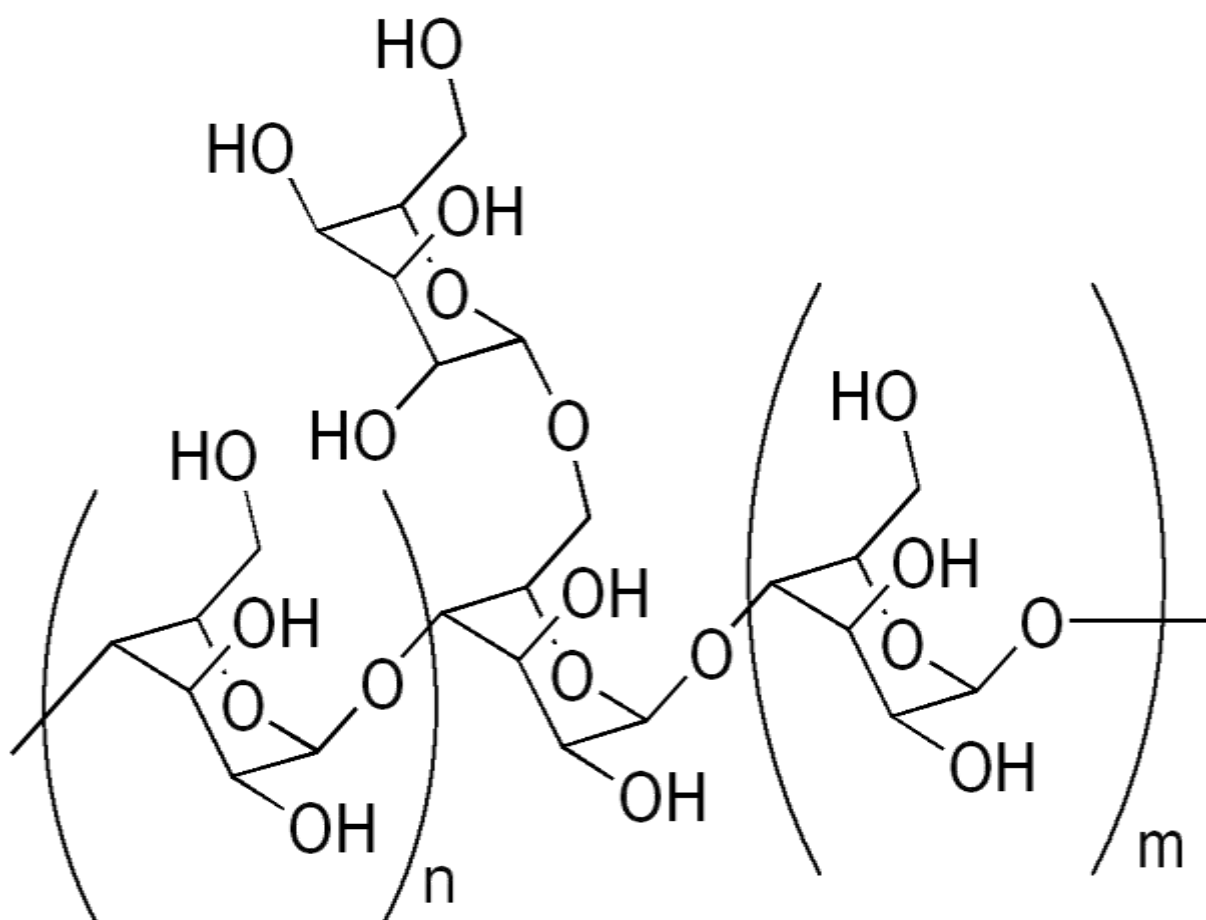


GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS**UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO**
SUB-UNIDAD DE SOPORTE AL DIAGNÓSTICO – PATOLOGÍA CLÍNICA**GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA**
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILLUS

Elaborado por: Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Patología Clínica	Revisado por: <ul style="list-style-type: none">• Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento• Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico• Unidad de Gestión de la Calidad	Aprobado por: Dra. Elizabeth Zulema Tomás Gonzáles de Palomino Directora General del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja
---------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS

**Guía de Procedimiento: Determinación cualitativa
de Antígeno Galactomanano de Aspergillus**

I.	Título.....	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivo	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS	3
VI.	Consideraciones Generales	3
	a. Definiciones Operativas	3
	1. Definición del Procedimiento.....	3
	b. Conceptos Básicos	4
	c. Requerimientos Básicos	4
VII.	Consideraciones Específicas	5
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....	5
	b. Indicaciones.....	8
	1. Indicaciones Absolutas	8
	c. Riesgos o complicaciones frecuentes.....	8
	d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes.....	8
	e. Contraindicaciones.....	8
VIII.	Recomendaciones	9
IX.	Autores, fecha y lugar.....	9
X.	Anexos	9
XI.	Bibliografía.....	10



Guía de Procedimiento de determinación cualitativa de Antígeno Galactomanano de Aspergillus

I. Título

Determinación Cualitativa de Antígeno Galactomanano de Aspergillus.

II. Finalidad

El manual de Procedimientos operativos estandarizados (POE) tiene por finalidad describir el procedimiento técnico en detalle para la determinación de Antígeno Galactomanano de Aspergillus, lo cual permitirá al personal de laboratorio cumplir con un procedimiento de trabajo estandarizado y requerido en la Norma NTP-ISO 15189:2014.

III. Objetivo

Estandarizar los procedimientos pre-analíticos y analíticos de laboratorio para la detección de Antígeno Galactomanano de Aspergillus en muestras biológicas, para el diagnóstico y seguimiento en el tratamiento de Aspergilosis invasiva.

IV. Ámbito de aplicación

La presente prueba se aplica en la Sub Unidad de Soporte al Diagnostico - Patología Clínica, del Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja (INSN – SB).

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPMS

Determinación cualitativa de Galactomanano (Código CPMS: 87305).

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

El Antígeno galactomanano de Aspergillus es una prueba de ensayo inmunoenzimática (EIA) tipo sándwich en microplaca, el ensayo utiliza anticuerpos monoclonales que recubren los pocillos de las microplacas, las muestras tratadas y los conjugados (Anticuerpo monoclonal contra galactomanano etiquetado con peroxidasa) se añaden a los pocillos recubiertos con anticuerpos monoclonales y se incuban, en presencia del antígeno de galactomanano se forma el complejo anticuerpo monoclonal-galactomanano-anticuerpo monoclonal/peroxidasa, los pocillos se lavan y se añade el cromógeno TMB que reaccionara con los complejos unidos al pocillo para formar una reacción color azul, la reacción se interrumpe con la adición de un ácido, cambiando el color azul a amarillo. Se determina su absorbancia (densidad óptica) de las muestras y controles en un lector de ELISA a longitudes de onda de 450 y 630 nm.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS**b. Conceptos Básicos**

- ✓ **Antígeno:** Cualquier sustancia que hace que el cuerpo produzca una respuesta inmunitaria contra ella. Los antígenos incluyen toxinas, sustancias químicas, bacterias, virus u otras sustancias de fuera del cuerpo. Los tejidos y las células corporales, incluso las células cancerosas, también contienen antígenos que pueden producir una respuesta inmunitaria. Estos antígenos también se pueden usar como marcadores en pruebas de laboratorio.
- ✓ **Anticuerpo:** Proteína elaborada por las células en respuesta a un antígeno, cada anticuerpo se puede unir a un solo antígeno específico. El propósito de esta unión es ayudar a destruir el antígeno. Algunos anticuerpos destruyen los antígenos directamente. Otros facilitan la tarea de los glóbulos blancos para destruir el antígeno. Un anticuerpo es un tipo de inmunoglobulina.
- ✓ **Antígeno galactomanano:** heteropolisacarido de la pared celular de *Aspergillus* spp, y que durante una infección invasora se expresa en los tejidos, sangre y tracto respiratorio

c. Requerimientos Básicos➤ **Equipos Biomédicos**

- Centrifuga de tubos.
- Centrifuga de microtubos de 2.0 ml.
- Agitador vórtex.
- Refrigerador-congelador de laboratorio.
- Cabina de flujo laminar vertical.
- Bloque calefactor de 120 °C.
- Incubadora de 37°C.
- Lavador de microplaca de ELISA.
- Lector de microplacas de ELISA.

➤ **Material Médico no Fungible**

- Micropipeta variable, 1 canal, 10-100 ul
- Micropipeta variable, 1 canal, 100-1000 ul
- Soporte en carrusel para micropipetas
- Gradilla de tubos
- Gradilla de microtubos de 1.5-2.0 ml
- Probeta graduada de vidrio de 500 ml
- Timer digital de 1 alarma

OCTUBRE 2020	GP-036/INSN-SB/USDT/SUSD-PC. V.01	Página 4 de 10
--------------	-----------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS➤ **Material Médico Fungible**• **Reactivos**

- Kit de Reactivo Platelia Aspergillus Ag (Microplacas, solución de lavado concentrada, sueros controles, conjugado, solución de pretratamiento de muestra, cromógeno solución TMB, solución de parada).

• **Materiales**

- Tubo de extracción de sangre al vacío.
- Agujas de extracción de sangre.
- Guantes de Nitrilo.
- Mascarilla médica desechable.
- Gorro desechable.
- Papel absorbente.
- Campo de trabajo.
- Microtubos de 1.5 - 2.0 ml.

• **Soluciones**

- Alcohol medicinal 70°.
- Agua desionizada

• **Responsables:**

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Médico con especialidad en Laboratorio Clínico
- Técnico de laboratorio.

VII. Consideraciones Específicas**a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento**

Tiempo: 160 minutos

a.1. Indicaciones pre-analíticas

1. La orden médica deberá ser entregada en la Sub Unidad de Soporte al Diagnostico - Patología Clínica, con los datos completos del paciente, sello y firma del médico, sello del SIS (si corresponde) (ver anexo 1).
2. No requiere ayunas

a.2. Materiales de toma de muestra

1. Tubo de extracción al vacío de 3.5 ml.
2. Aguja de extracción de sangre.
3. Guantes, gorro, mascarilla.

OCTUBRE 2020	GP-036/INSN-SB/USDT/SUSD-PC. V.01	Página 5 de 10
--------------	-----------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS**a.3. Procedimiento de toma de muestra**

1. La obtención de la muestra de sangre será mediante una punción venosa periférica (previa desinfección de la zona), utilizando una aguja de extracción de sangre y un tubo de extracción.
2. Las muestras de lavado broncoalveolar (LBA) serán recolectadas en un frasco estéril por el personal médico y entregadas a la recepción en la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Patología Clínica.

a.4. Transporte y almacenamiento de las muestras

1. Las muestras deben estar exentas de contaminación por hongos, esporas o bacterias, conservadas y transportadas en tubos sellados.
2. Los tubos con muestras de sangre serán centrifugados a 2500-3000 rpm x 5-10 min. para obtener el suero. Las muestras de LBA podrán analizarse como tal (muestras limpias) o sobre sobrenadantes centrifugados a 10.000 rpm x 10 min.
3. Las muestras no abiertas pueden conservarse a 2-8°C durante 48 horas, para almacenados más prolongados conservar el suero o LBA a -70°C.

a.5. Preparación y almacenamiento de los componentes del kit:

1. Los componentes del kit deben ser conservados a 2-8°C y serán llevados a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 30 min. antes de usarlos. Los reactivos serán estables hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
2. La preparación de la solución de lavado de trabajo se realizará añadiendo 1 parte de sol. lavado concentrada a 19 partes de agua desionizada; almacenar entre 20-25°C. Los demás componentes del kit vienen listos para su uso.

a.6. Calibración

El valor de los resultados obtenidos de las muestras está en base a cálculos mediante Cut-off.

a.7. Control de calidad

1. El kit incluye 3 niveles de controles líquidos, los cuales serán alicuotados en microtubos añadiendo un volumen de 300 ul y almacenados a -20°C, hasta su uso.
2. El control de valor de corte: su D.O debe ser ≥ 0.300 y ≤ 0.800 .
3. Control negativo: el índice debe ser < 0.40
Índice= D.O control negativo/D.O del promedio de los controles de corte
4. Control positivo: el índice debe ser > 1.5
Índice= D.O control positivo/D.O del promedio de los controles de corte
5. Si alguno de los controles no cumple con los criterios de validez el ensayo se considera no válido. Los controles y las muestras serán procesados de manera simultánea

OCTUBRE 2020	GP-036/INSN-SB/USDT/SUSD-PC. V.01	Página 6 de 10
--------------	-----------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS**a.8. Procesamiento de la muestra**

1. Pretratamiento: colocar en cada microtubo estéril:
300 ul de controles/ suero/LBA + 100 ul de la solución de Pretratamiento (R7). Cerrar bien los tubos.
2. Agitar enérgicamente o en vortex 5 segundos
3. Colocar los tubos en el bloque calefactor a 120°C x 6 min.
4. Centrifugar los tubos a 10.000 g x 10 min.
5. Colocar en un microplacas 1 tira de pocillos y rotular en este orden:

A	R5	MX 5
B	R4	MX 6
C	R4	MX 7
D	R3	MX 8
E	MX 1	...
F	MX 2	
G	MX 3	
H	MX 4	

6. En cada pocillo añadir: 50 ul de conjugado (R6) previamente invertido + 50 ul del sobrenadante de controles/suero/ LBA según corresponda
7. Cubrir los pocillos con un sellador y homogenizar la microplaca ligeramente 20 seg.
8. Incubar a 37°C x 90 min.
9. Haciendo uso del lavador de ELISA (verificando que contenga suficiente sol. de lavado de trabajo), realizar el lavado de la microplaca eligiendo la opción: T1 N5 800 ul
10. Invertir la microplaca suavemente sobre papel absorbente.
11. Añadir 200 ul de solución cromógeno TMB (R9) a cada pocillo, evitando la exposición a la luz intensa
12. Incubar la microplaca en oscuridad a temperatura ambiente x 30 min.
13. Añadir a cada pocillo 100 ul de solución de parada (R10)

a.9. Lectura del procedimiento

1. Realizar la lectura en el Lector de ELISA PR 4100, eligiendo la opción 90 para Aspergillus. El lector automáticamente emitirá el resultado final.
2. Cálculo de la D.O promedio de los controles de corte (R4): es la suma de los valores de D.O de cada control de corte y dividido entre 2.
3. Cálculo del índice para cada control negativo/control positivo/ muestras (X)
Índice= D.O de (X)/ D.O promedio de los controles de corte



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS

a.10. Interpretación de resultados

1. Los sueros con un índice < 0.500 se consideran negativos, y aquellos con un índice ≥ 0.500 se consideran positivos respecto del antígeno galactomanano y se recomienda repetir la prueba.
2. Los LBA con un índice < 1.00 se consideran negativos, y aquellos con un índice ≥ 1.00 se consideran positivos respecto del antígeno galactomanano y se recomienda repetir la prueba.

a.11. Informe de resultados

1. Los resultados son ingresados al sistema de registros de pacientes del área de Inmunología, por el Tecnólogo Médico de turno y posteriormente impresos.
2. El Médico Patólogo valida los resultados y los ingresa al sistema hospitalario Galenos (solo los resultados de los pacientes del INSN-SB)
Los resultados impresos y validados son entregados al personal de la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Patología Clínica, para su informe según corresponda la procedencia de la solicitud médica:
 - a. A la oficina de Archivos: los resultados de las solicitudes procedentes de consultorios del INSN-SB.
 - b. Al servicio de hospitalización: los resultados de las solicitudes procedentes de hospitalización.
 - c. Al archivo de la Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Patología Clínica: los resultados de las solicitudes externas al INSN-SB.

b. Indicaciones

1. Indicaciones Absolutas

La prueba está indicada para los pacientes con factores de riesgo de Aspergilosis invasiva, como trasplante alogénico de médula ósea, neutropénicos y con cáncer, el riesgo es intermedio para pacientes con trasplante autólogo de médula ósea, malnutrición, tratamiento con glucocorticoides, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), trasplantes de órganos para los pacientes con sospecha clínica de Aspergilosis invasiva.

c. Riesgos o complicaciones frecuentes

Ninguno

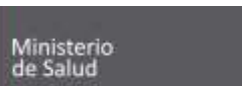
d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

El kit Platelia Aspergillus ag, no está evaluado para uso con plasma, orina ni LCR.

OCTUBRE 2020	GP-036/INSN-SB/USDT/SUSD-PC. V.01	Página 8 de 10
--------------	-----------------------------------	----------------



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS

VIII. Recomendaciones

1. Los resultados negativos no excluyen el diagnóstico de aspergilosis invasiva, por lo tanto se recomienda la repetición de la prueba si el resultado es negativo pero se sospecha de la presencia de la enfermedad.
2. Se recomienda la inspección regular (dos veces por semana) de las muestras de pacientes de alto riesgo para aumentar la sensibilidad y positividad temprana de la prueba.
3. Los resultados próximos al valor índice de corte (0.500) deben interpretarse con cautela y basarse en otras evidencias clínicas, radiológicas o de laboratorio de aspergilosis invasiva.

IX. Autores, fecha y lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja

Sub Unidad de Soporte al Diagnóstico - Patología Clínica.

Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento

Fecha de Elaboración: Octubre 2020

Vigencia: 02 años (contados a partir de la fecha de aprobación con Resolución Directoral)

Autores:

1. Dr. Emilio Aguilar Huauya eaguilar@insnsb.gob.pe
2. Lic. T.M. Yaquelina Chirinos Saire yachirinos@insnsb.gob.pe
3. Lic. T.M. Robert Reyna García rreyna@insnsb.gob.pe

X. Anexos

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO SAN BORJA (INNSB)
AV. AGUSTÍN DE LA ROSA TORO 1399 URB. JACARANDA - SAN BORJA
TELÉFONO : 01-1-2300600

ORDEN MEDICA 469747

PATOLOGIA CLINICA (306163)

N° H.C. : [REDACTED] Cuenta : 619266

Paciente : [REDACTED] Sexo : MASCULINO

Edad : 4 años 1 meses 1 días

Tipo Plan : SIS N° filial: (180 R 00602059) N° FUA : 20662717

Resumen H : Paciente varón de 4 años con DX LMA en abandono de tratamiento, cursa con tos productiva y fiebre pesar de tratamiento antibiótico A dic ASPERGILOSIS PULMONAR

Diagnóstico : C92.0 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

N° Movimiento : 306163

Fecha Solicitud : 22/09/2018 01:56:00pm Tipo At: Consultorios Ext

Procedencia : CONSULTA HEMATOLOGIA 1

N° Cama : ARAUJO CHAVEZ ROXANA LIZET

Prof de la Salud : CMP : 56841

CodCPT	Cod SIS	Procedimiento	Fecha Programada	Tipo Prov.	Cant.
87305		DETERMINACION CUALITATIVA DE GALACTOMANANO Dig: C92.0 -LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA Just: Paciente varón de 4 años con DX LMA en abandono de tratamiento, cursa con tos productiva y fiebre pe	24/09/2018 07:00:00 a.m.	INSTITUCIONAL	1

DEBE LLEGAR UNA HORA ANTES DE SU HORA PROGRAMADA

ARAUJO CHAVEZ ROXANA LIZET

SELLO Y FIRMA DEL PRESCRIPTOR

YCHIRNOS INNSB-05/54 29/09/2018 05:17:01pm

Page 1 of 1



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO: DETERMINACIÓN CUALITATIVA
DE ANTÍGENO GALACTOMANANO DE ASPERGILUS

XI. Bibliografía

1. Biorad Laboratories. Manual de Detección de antígeno circulante galactomanano (Aspergillus) en suero y Lavado Broncoalveolar Platelia® Aspergillus EIA. Ref 62794. www.biorad-rad.com
2. Hayden R, Pounds S, Knapp K, Petraitiene R, Schaufele RL, Sein T, Walsh TJ. Galactomannan antigenemia in pediatric oncology patients with invasive aspergillosis. *Rev Chil Infect* 2008; 25 (6): 483-485.
3. Olaechea P, Álvarez F, Zaldívar E. Invasive pulmonary aspergillosis in the non-neutropenic critical patient. Future challenges. *Med. Intensiva* vol.30 no.8 nov. 2006
4. Adam O, Auperin A, Wilquin F, Bourhis JH, Gachot B, Chachaty E. Treatment with piperacillin-tazobactam and false-positive Aspergillus galactomannan antigen test results for patients with hematological malignancies. *Clinical infectious diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2004;38:917-20.
5. Bialek R, Moshous D, Casanova JL, Blanche S, Hennequin C. Aspergillus antigen and PCR assays in bone marrow transplanted children. *European Journal of Medical Research* 2002;7:177-80.
6. Florent M, Katsahian S, Vekhoff A, Levy V, Rio B, Marie JP, et al. Prospective evaluation of a polymerase chain reaction-ELISA targeted to Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus for the early diagnosis of invasive aspergillosis in patients with hematological malignancies. *The Journal of Infectious Diseases* 2006;193:741-7.
7. Herrmann J, Gugel A, Freidank H, Bertz H, Finke J. Aspergillus antigen detection: comparison of a new sandwich ELISA with the latex agglutination test in patients with histologically proven invasive aspergillosis. *Mycoses* 1998;41 Suppl 1:83-5.
8. Rovira Tarrats M, Puig de la Bellacasa. [Aspergillus galactomannan detection in allogenic hematopoietic cell transplantation]. *Revista Iberoamericana de Micología* 2003;20:111-115.
9. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clinical Infectious Diseases* 2002;34:7-14.
10. Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clinical Infectious Diseases* : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2002;34:909-17.
11. Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clinical Infectious Diseases* 2007;44:531-40.

OCTUBRE 2020	GP-036/INSN-SB/USDT/SUSD-PC. V.01	Página 10 de 10
--------------	-----------------------------------	-----------------