

clarus
HISTOPLASMA GM
ENZYME IMMUNOASSAY

For the Qualitative Detection of *Histoplasma* Galactomannan – REF HGM201

R_x ONLY

IVD

For In Vitro
Use Only

2°C  8°C



TABLE OF CONTENTS

| | |
|---|-------|
| INTENDED USE | 1 |
| SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST | 1 |
| BIOLOGICAL PRINCIPLES | 2 |
| EXPLANATION OF THE TWO PROCEDURES | 2 |
| REAGENTS TABLE | 3 |
| MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED | 4 |
| WARNINGS AND PRECUATIONS | 4 |
| SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION | 5 |
| TEST PROCEDURE | 6-7 |
| READING THE TEST | 8 |
| QUALITY CONTROL & RESULTS | 9-13 |
| <i>STANDARD CURVE PROCEDURE</i> | 9-11 |
| <i>CALIBRATOR CUT-OFF PROCEDURE</i> | 12-13 |
| PERFORMANCE CHARACTERISTICS | 13-18 |
| <i>STANDARD CURVE PROCEDURE</i> | 13-15 |
| <i>CALIBRATOR CUT-OFF PROCEDURE</i> | 16-18 |
| LIMITATIONS | 19-20 |
| HAZARD AND PRECAUTIONARY INFORMATION | 20 |
| TROUBLESHOOTING | 21 |
| SYMBOLS TABLE | 22 |
| PORTUGUESE TRANSLATION | 23 |
| SPANISH TRANSLATION | 47 |
| BIBLIOGRAPHY | 71 |

Rev. 0

Rev. Date: 2019-05-08

INTENDED USE

The clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA (HGM201) is an immunoenzymatic, sandwich microplate assay used for the qualitative detection of *Histoplasma* galactomannan in urine samples. When used with other diagnostic procedures such as microbiological culture, histological examination of biopsy samples, and radiographic evidence, this test can be used as an aid in the diagnosis of histoplasmosis.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Histoplasma capsulatum (*H. capsulatum*) is a pathogenic dimorphic fungus found worldwide. It is endemic to the Ohio and Mississippi river valleys in the United States and to certain regions of Central and South Americas.¹ Histoplasmosis is caused by breathing in the fungus. It is typically found in dirt with large amounts of bird or bat droppings. It is one of the most frequent mycoses in the world, with over 100,000 cases of disseminated histoplasmosis occurring in AIDS patients worldwide each year.² Signs of infection often resemble flu-like symptoms, including fever, cough, fatigue, chills, headaches, chest pain, and/or body aches. Symptoms can appear anywhere from 3 to 21 days after exposure to the fungus occurs.³ The detection of antibodies to *H. capsulatum* by immunodiffusion and complement fixation are serological methods often used to offer rapid alternatives to microbiological techniques.³

The isolation of *H. capsulatum* by culture from clinical specimens remains the definitive diagnosis of histoplasmosis.^{4,3} However, culture often requires a two-to-four-week incubation period before the identification of the fungus is possible.⁵ A more rational approach to the diagnosis of histoplasmosis and the follow-up of patients may be the rapid detection of *H. capsulatum* antigen (specifically, galactomannan) in urine.⁶ The monoclonal antibodies used for detection in this kit have shown clinical utility in diagnosing histoplasmosis in patients.^{5,7}

BIOLOGICAL PRINCIPLES

HGM201 is an immunoenzymatic, sandwich microplate assay which detects *Histoplasma* galactomannan in urine. Galactomannan is a polysaccharide found in the cell wall. Monoclonal anti-*Histoplasma* IgG antibodies bound to microwell plates are used as capture antibodies. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-*Histoplasma* monoclonal IgG antibodies are used as detection reagents. Urine specimens are run untreated. The samples are added to the microwells coated with the capture antibodies and incubated.

If the patient specimen contains *Histoplasma* galactomannan, those antigens will become bound to the capture antibodies on the microwells. After incubation, the microwells are washed to remove unbound patient material. HRP detection antibodies are added to the microwells. After a second incubation, the microwells are washed to remove any unbound HRP detection antibodies. If antigen is present in the patient sample, a blue color develops with the addition of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB). The reaction is stopped by the addition of Stop Solution, where a yellow color develops. The optical density (absorbance) is checked with a microplate reader at 450 nm and a reference wavelength of 620/630 nm.


EXPLANATION OF THE TWO PROCEDURES

HGM201 has two methods to obtain results using urine samples; the Standard Curve Procedure and the Calibrator Cut-Off Procedure. The user should determine which procedure to use before starting the assay.

The Standard Curve procedure allows for better sensitivity from patient specimen. It uses 7 user-created standards, a positive control, a negative control, and a blank. Results of the procedure are in ng/mL.

The Calibrator Cut-Off Procedure uses fewer microwells by using one user-created calibrator, a positive control, a negative control, and a blank. However, it has reduced sensitivity. Results of the procedure are in EIA units.⁸

REAGENTS

| REAGENT | REF# | QTY | DESCRIPTION | Label Symbol | Hazard Symbol |
|------------------|--------|-------|---|--------------|--|
| Microwell Plate | HGMMW2 | 96 ea | A stripwell plate featuring breakaway polystyrene microwells coated with anti- <i>Histo</i> monoclonal Ab | 1 | N/A |
| 20X Wash Buffer | EIAWB1 | 50 mL | Concentrated wash buffer containing a preservative. | 2 | N/A |
| Standard | HGM100 | 3 mL | <i>Histoplasma</i> galactomannan from culture filtrate diluted in buffered protein solution to 100 ng/mL containing a preservative. | 3 | N/A |
| Positive Control | HGMPC2 | 1 mL | <i>Histoplasma</i> galactomannan in a buffered protein solution containing a preservative. | + | N/A |
| Negative Control | HGMNC2 | 1 mL | Buffered protein solution containing a preservative. | - | N/A |
| Conjugate | HGMDA2 | 10 mL | HRP-conjugated anti- <i>Histoplasma</i> IgG monoclonal antibody in a buffered solution containing a preservative. | 4 | N/A |
| TMB Substrate | EIATUS | 10 mL | Buffered solution containing tetramethylbenzidine (TMB). | 5 | N/A |
| Stop Solution | EIASS2 | 10 mL | Methanesulfonic acid. *WARNING: May be corrosive to metals. H290, P234, P390, P406. | 6 |  |

REAGENT STORAGE AND STABILITY

- The entire HGM201 test kit should be stored at 2-8 °C until the expiration dates listed on the labels. All reagents should be returned to 2-8 °C promptly after use.
- Unused microwells (**1**) should be placed back into the resealable Mylar bag and sealed immediately after opening and stored at 2-8 °C. Care should be taken to ensure the desiccant pouch remains in the bag with unused microwells.
- Avoid extended exposure of TMB Substrate (**5**) to light.
- After preparation, Wash Buffer can be used for 30 days if stored at 2-8°C when not in use. Always check for obvious signs of contamination on each new day of testing.

REAGENT PREPARATIONS

The entire kit, including the microwell plate, should be at 20-25 °C before and during use. Prepare a 1X solution of Wash Buffer by mixing 19-parts DI water with 1-part 20X Wash Buffer (**2**).

*Refer to SDS for complete hazard information.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- A. Pipettors capable of delivering ranges from 100-500 μ L and disposable tips
- B. Distilled or deionized water
- C. Microplate reader capable of reading absorbances at 450 and 620/630 nm with software capable of generating a four-parameter curve fit
- D. EIA plate washer or multi-channel pipettor for washing
- E. Timer
- F. Vortex Mixer
- G. Incubator set to 37 °C ($\pm 1^\circ$ C)
- H. Graduated cylinder for diluting wash buffer

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- A. Specific standardization is necessary to produce our high-quality reagents and materials. IMMY cannot guarantee the performance of its products when used with materials purchased from other manufacturers. Do not interchange reagents from different kit lot numbers or other manufacturers.
- B. The user assumes full responsibility for any modification to the procedures published herein.
- C. Avoid contact with Stop Solution (methanesulfonic acid). If exposed to skin or eyes, immediately flush with copious amounts of water.
- D. Avoid splashing when dispensing or aspirating reagents from the microwells as this causes errors.
- E. Inadequate washing can cause excessive background reactivity in any EIA protocol.
- F. Use only protocols described in this package insert. Incubation times or temperatures other than those specified may give errors.
- G. Maintain proper pipetting techniques and pattern throughout procedure to ensure optimal and reproducible results.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Using established techniques by qualified personnel, collect samples aseptically. When handling patient specimens, adequate measures should be taken to prevent exposure to potential etiologic agents. This assay has not been validated on specimens other than urine.

Specimens in transit between labs should be maintained at 2-8 °C. If a delay in specimen processing occurs, storage at 2-8 °C for 72 hours or -16 to -24 °C for up to 2 weeks is permissible. However, a very low-positive specimen could become negative after storage.

Prior to testing, specimens should be brought to 20-25 °C.

TEST PROCEDURE

| | |
|---------|--|
| Step 1 | Aliquot enough reagents necessary for tests being run that day, then return the remaining reagents to cold storage <i>(NOTE: When aliquoting TMB Substrate (5), protect the reagent from light)</i> |
| Step 2 | Bring all kit components to 20-25 °C |
| Step 3 | Prepare Standards for either the Standard Curve Procedure (See Table A) or the 12.5 ng/mL Calibrator Cut-Off for the Calibrator Cut-Off Procedure (See Table B) <i>(NOTE: Be sure to use a new pipette tip for every vial and vortex before performing each serial dilution.)</i> |
| Step 4 | Snap off a sufficient number of Capture Antibody-Coated Microwells (1) for patient samples, standards, and controls and insert them into the microwell holder, recording the position of each sample, standard, and control. <i>(NOTE: Place remaining microwells back into bag with desiccant and store at 2-8 °C.)</i> |
| Step 5 | Add 100 µL of the following to separate microwells: <ul style="list-style-type: none">• 1X Wash Buffer (2 diluted to 1X), which serves as the blank for the assay• Positive Control (+)• Negative Control (-)• Standards or Calibrator prepared in Step 3• Patient samples |
| Step 6 | Mix by gently shaking 1-5 seconds on the countertop or by gently tapping the microwell holder |
| Step 7 | Incubate plate at 37 ± 1 °C for 60 minutes ± 5 minutes |
| Step 8 | Using a pipettor, aspirate the contents from the microwells and discard into a biohazard receptacle changing tips between microwells |
| Step 9 | Wash all microwells with 1X Wash Buffer (2 diluted to 1X), using an EIA plate washer or multichannel pipettor and dump the plate contents after filling, following one of these options: <ol style="list-style-type: none">1. Wash the wells with 370µL of 1X Wash Buffer for a total of 3 washes.2. Wash the wells with 300µL of 1X Wash Buffer for a total of 5 washes. |
| Step 10 | After the final wash, strike the plate on a clean stack of paper towels or other clean, absorbent material hard enough to remove as much remaining 1X Wash Buffer (2) as possible |
| Step 11 | Add 100 µL of Conjugate (4) to each microwell and repeat Step 6 after all microwells are filled with 4 |

| | |
|---------|--|
| Step 12 | Incubate plate at 37 ± 1 °C for 45 minutes \pm 5 minutes |
| Step 13 | Repeat Steps 8-10 |
| Step 14 | Add 100 μ L of TMB Substrate (5) to each microwell. Start a timer for 30 minutes when 5 is added to the first microwell. Repeat Step 6 after all microwells are filled with 5 |
| Step 15 | Incubate at 37 ± 1 °C for the remainder of the 30 minute (\pm 1 minute) timer set in Step 15 |
| Step 16 | Add 100 μ L of Stop Solution (6) to each microwell in the same order as Step 15 |
| Step 17 | Read and record results (NOTE: Reading should take place within 15 minutes) |

TABLE A: STANDARD CURVE REAGENTS

| Tube | Standards (ng/mL) | Volume of Standard | Volume of 1X 2 |
|------|-------------------|--------------------|----------------|
| A | 25 | 250 μ L 3 | 750 μ L |
| B | 12.5 | 500 μ L Tube A | 500 μ L |
| C | 6.25 | 500 μ L Tube B | 500 μ L |
| D | 3.1 | 500 μ L Tube C | 500 μ L |
| E | 1.6 | 500 μ L Tube D | 500 μ L |
| F | 0.8 | 500 μ L Tube E | 500 μ L |
| G | 0.4 | 500 μ L Tube F | 500 μ L |

TABLE B: CALIBRATOR CUT-OFF REAGENTS

| Tube | Calibrator (ng/mL) | Volume of Standard | Volume of 1X 2 |
|------|--------------------|--------------------|----------------|
| A | 25 | 250 μ L 3 | 750 μ L |
| B | 12.5 | 500 μ L Tube A | 500 μ L |

READING THE TEST

- A. Mix by gently tapping the side of the plate or shaking on the countertop for 1-5 seconds.
- B. Carefully wipe the undersides of the wells with a clean, lint-free tissue and measure the absorbance of each microwell as outlined on the following page.
 - 1. A dual wavelength reader is required, with absorbances read at 450 nm and 620/630 nm. Blank on the 1X Wash Buffer (**2**). This assay has not been validated with a single wavelength reader.
- C. Discard used assay materials as hazardous waste and retain microwell holder.
- D. Disinfect the microwell holder with a disinfectant such as:
 - 1. A solution of 10% bleach
 - 2. 70% ethanol
 - 3. 1% Lysol brand I.C.™

Note: If using automation to run the assay, please contact the equipment manufacturer for further instructions.

QUALITY CONTROL & RESULTS

A. The Quality Control and results for each type of run **cannot** be used interchangeably.

B. STANDARD CURVE PROCEDURE

| STANDARD | ACCEPTABLE VALUE |
|--------------------|----------------------------------|
| 25 | 1.100 - 2.100 Blanked OD |
| 12.5 | 0.550 - 1.050 Blanked OD |
| 6.25 | 0.275 - 0.525 Blanked OD |
| 3.1 | 0.138 - 0.263 Blanked OD |
| 1.6 | 0.069 - 0.131 Blanked OD |
| 0.8 | 0.034 - 0.066 Blanked OD |
| 0.4 | 0.011 - 0.033 Blanked OD |
| PC | 4.0 - 7.0 ng/mL |
| NC | < 0.2 ng/mL |
| 1X Wash Buffer (2) | Raw OD < 0.120 |
| R ² | ≥ 0.990 Four-Parameter Curve Fit |

| RESULTS | CONCENTRATION |
|----------|---------------|
| Negative | < 0.20 ng/mL |
| Positive | ≥ 0.20 ng/mL |

1. Quality Control:

An assay is considered valid when the Standards, Positive Control (PC), Negative control (NC), and R² fall within the acceptable ranges as defined in the tables above.

The Positive Control, Negative Control, and standards must be included with each batch of patient specimens to provide quality assurance of the reagents. The Positive and Negative controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The Positive Control should not be used as an indicator of standards precision and only ensures reagent functionality.

If the concentration of the Positive Control and/or Negative Control is not within these parameters, patient test results should be considered invalid and the assay should be repeated.

Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations.

2. Results:

Calculate the concentration (ng/mL) by the following:

- i. Calculate the average value for each of the standard curve points.
- ii. Plot the standard curve values using the following table:

| ng/mL (X-Axis) | ABSORBANCE (Y-AXIS) |
|----------------|-------------------------------|
| 25 | Average of wells (25 ng/mL) |
| 12.5 | Average of wells (12.5 ng/mL) |
| 6.25 | Average of wells (6.25 ng/mL) |
| 3.1 | Average of wells (3.1 ng/mL) |
| 1.6 | Average of wells (1.6 ng/mL) |
| 0.8 | Average of wells (0.8 ng/mL) |
| 0.4 | Average of wells (0.4 ng/mL) |

iii. Using the spectrophotometer software, calculate a 4-parameter curve fit:

$$\text{Concentration} = C \left[\frac{(A - D)}{(\text{Blanked OD} - D)} - 1 \right]^{(1/B)}$$

iv. The patient concentrations are calculated by substituting the absorbance values (blanked OD). See below.

EXAMPLE RESULTS AND CALCULATIONS*:

| CURVE FIT PARAMETERS | CALCULATED VALUES |
|----------------------|-------------------|
| A | -0.019 |
| B | 0.964 |
| C | 496 |
| D | 47.3 |

Using the standard curve equation shown above, for a sample that gives a blanked OD absorbance of 0.695, the concentration would be calculated as follows:

$$\text{Concentration} = C \left[\frac{(A - D)}{(\text{Blanked OD} - D)} - 1 \right]^{(1/B)}$$
$$\text{Concentration} = 496 \left[\frac{(-0.019 - 47.3)}{(0.695 - 47.3)} - 1 \right]^{(1/0.964)} = 6.501 \text{ ng/ml}$$

**Numbers here are only intended as examples for demonstration purposes, do not use these numbers for your own calculations*

C. CALIBRATOR CUT-OFF PROCEDURE

| CONTROLS | | ACCEPTABLE VALUE | |
|----------------|-----|--------------------------|--|
| 12.5 Std | | Blanked OD 0.640 – 1.000 | |
| PC | | 3.0 - 7.0 EIA Units | |
| NC | | <1.0 EIA Units | |
| 1X Wash Buffer | (2) | Raw OD < 0.120 | |

| RESULTS | | EIA UNITS | |
|----------|--|-----------------|--|
| Negative | | <1.0 EIA Units | |
| Positive | | ≥ 1.0 EIA Units | |

1. Quality Control:

An assay is considered valid when the 12.5 ng/mL Calibrator Cut-Off (CC), Positive Control (PC), and Negative Control (NC) fall within the acceptable ranges as defined in the table above.

The Positive Control, Negative Control, and 12.5 ng/mL Calibrator Cut-Off must be included with each batch of patient specimens to provide quality assurance of the reagents. The Positive and Negative controls are intended to monitor for substantial reagent failure. The Positive Control should not be used as an indicator of the Calibrator Cut-Off precision and only ensures reagent functionality.

If the EIA units of the Positive Control and/or Negative Control are not within these parameters, patient test results should be considered invalid and the assay should be repeated.

Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organizations.

2. Results:

Calculate concentration (EIA Units) by the following:

- i. Calculate the average value for the 12.5ng/mL standard.
- ii. Using the following equation, calculate sample EIA Units:

$$EIA\ Units = \left[\frac{Sample\ Blanked\ OD}{(12.5\ Std\ Blanked\ OD)} \times 10 \right]$$

EXAMPLE:

$$\left[\frac{0.327}{0.812} \times 10 \right] = 4.03\ EIA\ Units$$

- iii. Using the table above, compare the sample EIA Units to determine a positive or negative result.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

A. STANDARD CURVE PROCEDURE

1. Interference:

HGM201 was evaluated for the potential of interference on the following urine conditions: bloody urine, proteinuria, mucus, casts, epithelial cells in urine, ketonuria, and bilirubin. These samples exhibit no interference in the assay.

2. Cross-Reactivity:

HGM201 was evaluated for cross-reactivity against a panel of patient specimens across a variety of different pathologies. The results of this testing are shown in the table on the following page.

| Pathology | Number of Specimens | % Positive |
|---------------------------|---------------------|------------|
| <i>Paracoccidioides</i> * | 1 | 100% (1/1) |
| <i>Blastomyces</i> | 11 | 64% (7/11) |
| <i>Candida</i> | 10 | 10% (1/10) |
| <i>Coccidioides</i> | 9 | 0% (0/9) |
| <i>Aspergillus</i> | 8 | 0% (0/8) |
| <i>Cryptococcus</i> | 5 | 0% (0/5) |
| <i>Verticillium</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Mucormycosis</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Pneumocystis</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Malassezia</i> | 1 | 0% (0/1) |

*Indicates use of ID antigen as no patient specimen available for Performance Characteristics

3. Method Comparison:

The HGM201 was compared to IMMY's ALPHA *Histoplasma* EIA (HAG102) in-house. A total of 277 urine specimens were tested on both assays according to their package inserts. Analysis of this data was performed to determine percent agreement positive and percent agreement negative. The results of this comparison are shown in the tables below:

| | | IMMY HAG102 | |
|---------------------------------|------|----------------|------|
| | | Pos. | Neg. |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 48 | 35 |
| | Neg. | 10 | 184 |

| | Calculated | 95% CI |
|----------------------|------------|-------------|
| % Positive Agreement | 82.76% | 70.6%-91.4% |
| % Negative Agreement | 84.02% | 79.5%-88.6% |

The comparison to HAG102 resulted in 35 “false-positives” on HGM201. After further analysis of those specimens, it was concluded that 27 of those were proven histoplasmosis cases. Out of the 8 “false-positives” that were not proven histoplasmosis cases, 6 were *Blastomyces* sp. culture-confirmed cases, which has shown to be cross-reactive on the assay. The following tables show this information:

| | | IMMY HAG102 | |
|---------------------------------|------|----------------|------|
| | | Pos. | Neg. |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 48 | 2 |
| | Neg. | 10 | 185 |

| | Calculated | 95% CI |
|----------------------|------------|-------------|
| % Positive Agreement | 82.76% | 70.6%-91.4% |
| % Negative Agreement | 98.92% | 96.2%-99.9% |

4. Precision:

Precision (Reproducibility) on HGM201 was evaluated at IMMY by running standards and a panel of five specimens on HGM201 according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP-17A. The specimen panel was tested once a day for a total of 5 days. Samples tested: Standards (made following package insert), three positive urines (high positive, medium positive, and low positive), and two negative urines.

For precision, the mean, standard deviation, and %CV were calculated for the blanked OD and concentration values. The results are shown in the table on the following page:

| Concentration | | | |
|-----------------------|-----------------|-------|--------|
| | Mean (ng/mL) | SD | %CV |
| High Positive Urine | 26.398 | 1.179 | 4.466 |
| Medium Positive Urine | 7.156 | 0.308 | 4.298 |
| Low Positive Urine | 1.262 | 0.154 | 12.165 |
| Negative Urine 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Negative Urine 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Positive Control | 5.557 | 0.387 | 6.961 |
| Negative Control | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

B. CALIBRATOR CUT-OFF PROCEDURE

1. Interference:

HGM201 was evaluated for potential of interference on the following urine conditions: Bloody urine, Proteinuria, Mucus, Casts, Epithelial cells in urine, Ketonuria, and Bilirubin. These samples exhibit no interference in the assay.

2. Cross-Reactivity:

HGM201 was evaluated for cross-reactivity against a panel of patient specimens across a variety of different pathologies. The results of this testing are shown in the table on the following page.

| Pathology | Number of Specimens | % Positive |
|---------------------------|---------------------|------------|
| <i>Paracoccidioides</i> * | 1 | 100% (1/1) |
| <i>Blastomyces</i> | 11 | 55% (6/11) |
| <i>Candida</i> | 10 | 0% (0/10) |
| <i>Coccidioides</i> | 9 | 0% (0/9) |
| <i>Aspergillus</i> | 8 | 0% (0/8) |

| Pathology | Number of Specimens | % Positive |
|---------------------|---------------------|------------|
| <i>Cryptococcus</i> | 5 | 0% (0/5) |
| <i>Verticillium</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Mucormycosis</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Pneumocystis</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Malassezia</i> | 1 | 0% (0/1) |

*Indicates use of ID antigen as no patient specimen available for Performance Characteristics

3. Method Comparison

HGM201 was compared to HAG102 in-house. A total of 277 urine specimens were tested on both assays according to their package inserts. Analysis of this data was performed to determine percent agreement positive and percent agreement negative. The results of this comparison are shown in the tables below:

| | | IMMY HAG102 | | | Calculated | 95% CI |
|---------------------------------|------|----------------|------|-------------------------|------------|---------------|
| | | Pos. | Neg. | | | |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 47 | 31 | % Positive Agreement | 81.03% | 68.59%-90.13% |
| | Neg. | 11 | 188 | % Negative Agreement | 85.84% | 80.51%-90.18% |

The comparison to HAG102 resulted in 31 “false-positives” on HGM201. After further analysis of those specimens, it was concluded that 25 of those were proven histoplasmosis cases. Out of the 6 “false-positives” that were not proven histoplasmosis cases, 5 were *Blastomyces* culture-confirmed cases, which has shown to be cross-reactive on the assay. The tables on the following page show this information.

| | | IMMY HAG102 | | | Calculated | 95% CI |
|---------------------------------|------|----------------|------|-------------------------|------------|---------------|
| | | Pos. | Neg. | | | |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 47 | 1 | % Positive Agreement | 81.03% | 68.59%-90.13% |
| | Neg. | 11 | 188 | % Negative Agreement | 99.47% | 97.47%-99.99% |

4. Precision:

Precision (Reproducibility) on HGM201 was evaluated at IMMY by running standards and a panel of five specimens on HGM201 according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP-17A. The specimen panel was tested once a day for a total of 5 days. Samples tested: Standard (made following package insert), three positive urines (high positive, medium positive, and low positive), and two negative urines.

For precision, the mean, standard deviation, and %CV were calculated for the blanked OD and EIA Unit Values. The results are shown in the tables on the following page:

| Concentration | | | |
|-----------------------|---------------------|-------|--------|
| | Mean (EIA units) | SD | %CV |
| High Positive Urine | 24.436 | 0.712 | 2.9% |
| Medium Positive Urine | 5.164 | 0.292 | 5.6% |
| Low Positive Urine | 0.731 | 0.097 | 13.2% |
| Negative Urine 1 | -0.235 | 0.036 | -15.3% |
| Negative Urine 2 | -0.227 | 0.053 | -23.3% |
| Positive Control | 3.813 | 0.322 | 8.5% |
| Negative Control | -0.098 | 0.047 | -48.3% |

LIMITATIONS

- HGM201 is intended for use with urine specimens. This assay has not been validated on specimens other than urine.
- Only allow the needed volume of reagents required for the number of microwells to be used to warm to room temperature. Performance of reagents is not determined when exposed to temperature fluctuations.
- A negative result does not exclude diagnosis of histoplasmosis.
- HGM201 was found to be cross-reactive with *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, and some *Candida* specimens. Positive tests should be confirmed in areas or patient groups where these organisms are endemic or a risk.
- HGM201 is not intended for monitoring therapy.
- Inadequate washing during the test procedure can cause excessive background reactivity.
- Use only protocols described in this package insert. Incubation times or temperatures other than those specified might give inaccurate results.
- The performance of HGM201 has not been established for manual reading and/or visual result determination.
- Testing should not be performed as a screening procedure for the general population. The predictive value of a positive or negative result depends on the pretest likelihood of histoplasmosis disease being present. Testing should only be done when clinical evidence suggests the diagnosis of histoplasmosis.
- It is possible for negative patient specimen microwells to be contaminated by positive control/patient specimen microwells if the contents of one microwell spill over into another microwell. This could be due to rough handling of the microplate or poor pipetting technique while adding reagents.

- Even though it was not tested in HGM201, *Talaromyces marneffe* is known to cross-react with *Histoplasma* antibodies.
- The performance of HGM201 is unknown when specimens including the following substances are tested: foods which produce color in urine, vaginal cream, caffeine, ascorbic acid, itraconazole, amphotericin B., acetaminophen, or acetylsalicylic acid.
- Results between different *Histoplasma capsulatum* assays cannot be compared.












HAZARD AND PRECAUTIONARY INFORMATION

Refer to the product Safety Data Sheets (SDS) for Hazards and Precautionary Statements.

TROUBLESHOOTING

| PROBLEM | SOLUTION |
|---|---|
| Variable results across replicates | <ul style="list-style-type: none">• Set-up standards, controls, and samples in a separate, clean, non-coated 96-well plate• Use multichannel to pipette from the 96-well plate into the microwells (1) |
| Suspected contamination of microwells | <ul style="list-style-type: none">• Gently tap the plate to mix reagents in microwells to avoid splashing• Take precaution when pipetting to ensure no splashing or carry-over from neighboring microwells occurs• Change tips between microwells |
| Standard curve failing | <ul style="list-style-type: none">• Take care when prepping standards: vortex between dilutions, use precise and careful pipetting techniques, and change tips between dilutions |
| Lower ODs than expected (Reagents too cold) | <ul style="list-style-type: none">• Make sure all reagents come to 20-25°C before testing• Store reagents in a temperature-controlled environment (e.g. incubator set to 25 °C) when bringing them to 20-25°C |
| Edge effects? | <ul style="list-style-type: none">• Edge effects have been found to be insignificant |
| Using samples other than urines? | <ul style="list-style-type: none">• This assay is for urine specimens only |

SYMBOLS

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | Contains sufficient for XX determinations |  | Catalogue Number/Reference Number |
|  | Consult instructions for use |  | Batch/Lot Number |
|  | Manufacturer |  | For In Vitro diagnostic use |
|  | Use By/Expiration date |  | Authorized Representative in the European Community |
|  | Temperature Limitation |  | Control |
|  | CE mark of conformity | | |

PORTUGUÊS

TABLE OF CONTENTS

| | |
|--|--------------|
| UTILIZAÇÃO | 25 |
| RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE..... | 25 |
| PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS | 26 |
| EXPLICAÇÃO DOS DOIS PROCEDIMENTOS | 26 |
| REAGENTES..... | 27 |
| MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM, NÃO FORNECIDOS | 28 |
| ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES | 28 |
| COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS | 29 |
| PROCEDIMENTO DE TESTE | 30-31 |
| INTERPRETANDO O TESTE | 32 |
| CONTROLE DE QUALIDADE & RESULTADOS | 33-37 |
| <i>PROCEDIMENTO DE CURVA PADRÃO.....</i> | <i>33-35</i> |
| <i>PROCEDIMENTO DE CORTE BASEADO NO CALIBRADOR</i> | <i>36-37</i> |
| CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE | 37-42 |
| <i>PROCEDIMENTO DE CURVA PADRÃO.....</i> | <i>37-40</i> |
| <i>PROCEDIMENTO DE CORTE BASEADO NO CALIBRADOR</i> | <i>40-42</i> |
| LIMITAÇÕES..... | 43-44 |
| INFORMAÇÃO DE RISCOS E ADVERTÊNCIAS | 44 |
| SOLUÇÃO DE PROBLEMAS | 45 |
| SÍMBOLOS | 46 |
| BIBLIOGRAFIA | 71 |

UTILIZAÇÃO

O *clarus Histoplasma Galactomannan EIA (HGM201)* é um ensaio imunoenzimático do tipo sanduíche utilizado para a detecção qualitativa da galactomanana de *Histoplasma* em amostras de urina. Quando utilizado com outros procedimentos de diagnósticos, tais como cultura microbiológica, exame histológico de amostras de biópsia, e evidências radiográficas, este teste pode ser utilizado no auxílio do diagnóstico de histoplasmose.

RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

O *histoplasma capsulatum (H. capsulatum)* é um fungo patogênico dimórfico de disseminação mundial. O fungo é endêmico dos vales dos rios Ohio e Mississipi nos Estados Unidos, e de certas regiões da América Central e do Sul.¹ Histoplasmose é causada pela inspiração do fungo. O fungo é tipicamente encontrado no solo em locais com a presença de excremento de pássaros e morcegos em grande quantidade. A histoplasmose é uma das micoses mais frequentes do mundo, com mais de 100.000 casos por ano de histoplasmose disseminada dentre pacientes com AIDS ao redor do mundo.² Os sintomas da doença muitas vezes são semelhantes aos sintomas de Influenza, tais como febre, tosse, cansaço, calafrios, e dores no peito e no corpo. Os sintomas aparecem dentro de 3 a 21 dias após a exposição ao fungo.³ A detecção de anticorpos a *H. capsulatum* por imunodifusão e fixação complementar são métodos serológicos utilizados com frequência para oferecer uma alternativa mais rápida do que as técnicas microbiológicas.³

O isolamento de *H. capsulatum* por cultura de amostras clínicas ainda é o diagnóstico definitivo de histoplasmose.^{4,3} Porém, cultura normalmente requer um período de incubação de 2-4 semanas até que o fungo possa ser identificado.⁵ Uma abordagem mais racional para o diagnóstico e acompanhamento de histoplasmose pode ser a detecção de antígeno *H. capsulatum* (especificamente a galactomanana) em urina.⁶ Os anticorpos monoclonais utilizados neste kit demonstraram utilidade clínica no diagnóstico de histoplasmose em pacientes.^{5,7}

PRINCÍPIOS BIOLÓGICOS

O HGM201 é um ensaio imunoenzimático que detecta A galactomanana de *Histoplasma* na urina. A galactomanana é um polissacarídeo encontrado na parede celular. Anticorpos Giga monoclonais anti-*Histoplasma* imobilizados no fundo dos micro-poços da microplaca são utilizados como anticorpos de captura enquanto anticorpos IgG monoclonais anti-*Histoplasma* conjugados em peroxidase de rábano (Horseradish peroxidase, HRP) são utilizados como reagentes de detecção. As amostras de urina são testadas sem nenhum tratamento. Cada amostra é adicionada aos micro-poços de testes revestidos com anticorpos de captura e então incubada.

Se a amostra do paciente contém galactomanana de *Histoplasma* reconhecida pelo anticorpo de captura, esses antígenos formarão uma ligação com o anticorpo imobilizado no micro-poço. Após o período de incubação, os micro-poços são lavados para remoção de qualquer resquício da amostra que não formou ligação com o anticorpo de captura. Após esta etapa, o anticorpo de detecção conjugado em peroxidase de rábano (Horseradish peroxidase, HRP) é adicionado aos micro-poços. Novamente a placa é lavada, agora para a retirada dos antígenos de detecção que não formaram ligação. Para a revelação, são utilizados 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidina (TMB) e a solução reveladora. Na presença do anticorpo secundário uma coloração azul surgirá com a adição do Substrato TMB. A reação é interrompida pela adição da solução reveladora, onde então formará uma coloração amarela. A densidade ótica (absorbância) é determinada por uma leitora de microplacas a 450nm e uma leitura num comprimento de onda referencial a 620/630nm.


EXPLICAÇÃO DOS DOIS PROCEDIMENTOS

O HGM201 tem dois procedimentos de teste utilizando amostras de urina: O procedimento de curva padrão (Standard Curve Procedure) e o procedimento de corte baseado no calibrador (Calibrator Cut-off Procedure). O usuário deve determinar qual procedimento será utilizado antes de iniciar o teste.

O procedimento de curva padrão gera resultados com uma sensibilidade maior. Ele usa 7 padrões preparados pelo usuário, um controle positivo, um controle negativo, e uma controle em branco. Os resultados deste procedimento são em ng/mL.

O procedimento de corte baseado no calibrador utiliza menos micro-poços pois só requer 1 (um) padrão preparado pelo usuário, um controle positivo, um controle negativo, e o controle em branco. No entanto, este procedimento tem sua sensibilidade reduzida. Os resultados deste procedimento são em unidades EIA.⁸

REAGENTES

| REAGENT | REF# | QTY | DESCRIPTION | Label Symbol | Hazard Symbol |
|------------------|--------|-------|--|--------------|---|
| Microwell Plate | HGMMW2 | 96 ea | Uma placa de com tiras de micro-poços de poliestireno quebráveis com anticorpos monoclonais anti- <i>Histo</i> imobilizados no fundo. | 1 | N/A |
| 20X Wash Buffer | EIAWB1 | 50 mL | Tampão de lavagem concentrado contendo uma substância preservativa. . | 2 | N/A |
| Standard | HGM100 | 3 mL | Galactomanana de <i>Histoplasma</i> oriundo de filtrado de cultura, diluído em uma solução proteica tamponada de concentração 100ng/mL contendo uma substância preservativa. | 3 | N/A |
| Positive Control | HGMPC2 | 1 mL | Galactomanana de <i>Histoplasma</i> em uma solução proteica tamponada contendo uma solução preservativa. | + | N/A |
| Negative Control | HGMNC2 | 1 mL | Solução proteica tamponada contendo uma solução preservativa. | - | N/A |
| Conjugate | HGMDA2 | 10 mL | Anticorpos IgG monoclonais anti- <i>Histoplasma</i> conjugados com peroxidase de rábano (HRP) em uma solução tamponada contendo uma solução p reservativa. | 4 | N/A |
| TMB Substrate | EIATUS | 10 mL | Solução tamponada contendo Tetrametil Benzidina (TMB) | 5 | N/A |
| Stop Solution | EIASS2 | 10 mL | Ácido metanosulfônico. *ATENÇÃO Pode ser corrosivo à metais. H290, P234, P390, P406. | 6 |  |

REAGENT STORAGE AND STABILITY

- Todos os componentes do kit HGM201 deve ser armazenado de 2 à 8°C até a data de validade (especificada na etiqueta). Todos os reagentes devem retornar para 2 à 8°C imediatamente após o uso.
- Os micro-poços (**1**) não utilizados devem permanecer no envelope térmico e fechado imediatamente após aberto e armazenado de 2 à 8°C. É importante que o dessecante permaneça dentro do envelope com os micro-poços não utilizados.
- Evite a exposição prolongada do substrato de TMB (**5**) à luz.
- Após a sua preparação, o Tampão de Lavagem pode ser utilizado por até 30 dias se armazenado de 2 à 8°C enquanto estiver fora de uso. Inspeccione visualmente o tampão de lavagem para averiguar qualquer sinal de contaminação microbial antes de cada uso.

REAGENT PREPARATIONS

Todo o kit, incluindo a placa de micro-poços, deve estar entre 20 e 25°C antes e durante o uso. Prepare a solução 1X do tampão de lavagem da seguinte maneira: misture 19 partes de água deionizada com 1 parte do tampão de lavagem 20X (2).

*Consulte a Ficha de Dados de Segurança (SDS) para as informações de segurança completas.

MATERIAIS NECESSÁRIOS, PORÉM, NÃO FORNECIDOS

- A. Pipeta capaz de dispensar entre 100-500µL e ponteiras descartáveis
- B. Água destilada ou desmineralizada
- C. Leitor de microplacas capaz de ler absorvâncias em 450nm e 620/630nm com software capaz de gerar um ajuste de curva de quatro parâmetros (curva de calibração)
- D. Máquina lavadora de microplacas de teste ELISA, ou pipeta multicanal para lavagem.
- E. Cronômetro
- F. Misturador de Vórtice
- G. Incubadora configurada para 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)
- H. Cilindro graduado para diluir o Tampão de Lavagem

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

- A. Para produzir os nossos reagentes e materiais de alta qualidade é necessária padronização específica. A IMMY não garante a performance do seu produto quando utilizado com materiais adquiridos de outros fabricantes. Não é recomendado o uso de reagentes oriundos de um kit de lote de fabricação diferente, ou de outros fabricantes.
- B. O usuário assume total responsabilidade por qualquer modificação dos procedimentos listados neste documento.
- C. Evite contato com a Solução reveladora (ácido metanossulfônico). Caso haja contato com os olhos, lave-os imediatamente com água corrente em abundância.
- D. Evite respingos durante o processo de transferência/remoção de reagentes de/para os poços, pois isso pode causar resultados errôneos.
- E. Lavagem inadequada pode causar excesso de reatividade no plano de fundo de qualquer protocolo de ensaio imunoenzimático.
- F. Siga somente o protocolo descrito neste folheto informativo. Duração de incubações ou temperaturas diferentes das especificadas neste documento podem causar resultados errôneos.

G. Mantenha um padrão apropriado de técnicas de pipetagem durante todo o procedimento do teste para garantir resultados otimizados e reprodutíveis.

COLETA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Colete a amostra assepticamente utilizando técnicas estabelecidas por funcionário(a) qualificado. Enquanto estiver manuseando amostras de pacientes, medidas adequadas devem ser tomadas para evitar a exposição à agentes etiológicos potencialmente presentes. O uso de amostras que não sejam urina ainda não foi estabelecido.

Amostras em trânsito entre laboratórios devem ser mantidas entre 2 e 8°C. Se houver atraso no processamento da amostra, armazene-a entre 2 e 8°C por até 72h ou entre -16 e -24°C por até 2 semanas. No entanto, uma amostra de baixa positividade pode gerar resultados negativos após armazenada.

As amostras devem ser levadas a temperatura ambiente (20-25°C) antes de iniciar o teste.

PROCEDIMENTO DE TESTE

| | |
|----------|--|
| Passo 1 | Separe uma quantidade suficiente de reagentes para os testes sendo realizados neste dia, e retorne o restante dos reagentes para 2-8°C <i>(OBS: Quando for separar o Substrato TMB (5), proteja o reagente da luz)</i> |
| Passo 2 | Traga todos os componentes do kit à 20-25°C |
| Passo 3 | Prepare os padrões/calibrador para o procedimento que você irá realizar: Procedimento de Curva Padrão (Tabela A) ou Procedimento de corte baseado no calibrador (Tabela B). <i>(OBS: Certifique-se que está utilizando uma ponteira de pipeta nova para cada frasco, e misture com o vórtice antes de cada diluição em série.)</i> |
| Passo 4 | Quebre a quantidade suficiente de Micro-poços imobilizados com anticorpos de captura (1) para as amostras de pacientes, padrões, e controles e os insira na placa. Registre a posição de cada amostra, padrão, e controle na placa. <i>(OBS: Armazene os micro-poços não utilizados ao envelope térmico com o dessecante e armazene entre 2-8°C)</i> |
| Passo 5 | Adicione 100 µL dos seguintes reagentes aos micro-poços: <ul style="list-style-type: none">• Tampão de Lavagem 1X (2 já diluído), que servirá como o controle do branco para o teste• Controle Positivo (+)• Controle Negativo (-)• Calibrador/padrões preparados no passo 3• Amostras de Pacientes |
| Passo 6 | Misture a placa gentilmente mexendo a placa devagar no balcão ou bata levemente na lateral da placa 5x |
| Passo 7 | Incube a placa em 37 ± 1 °C por 60 minutos ± 5 minutos |
| Passo 8 | Utilizando uma pipeta, aspire o conteúdo dos micro-poços e descarte-os em um receptáculo para materiais de risco biológico, trocando de ponteira entre cada micro-poço |
| Passo 9 | Encha todas os micro-poços com o Tampão de Lavagem 1x (2 já diluído), utilizando uma máquina de lavagem de ELISAs, ou com uma pipeta multi-canal e despeje o conteúdo da placa após encher todos os micro-poços, utilizando um dos métodos a seguir: <ol style="list-style-type: none">1. Encha todos os micro-poços com 370µL do Tampão de Lavagem 1x e despeje. Repita por 3 vezes ao todo.2. Encha todos os micro-poços com 300µL do Tampão de Lavagem 1x e despeje. Repita por 5 vezes ao todo. |
| Passo 10 | Após a última lavagem, bata com a placa (micro-poços virados para baixo) em uma pilha de papel-toalha ou outro material absorvente e limpo com força suficiente para remover o máximo possível do Tampão de Lavagem 1X (2) que restou nos micro-poços |

| | |
|----------|--|
| Passo 11 | Adicione 100 µL do conjugado (4) em cada micro-poço e repita o passo 6 quando todos os micro-poços estiverem com conjugado (4) |
| Passo 12 | Incube a placa em 37 ± 1 °C por 45 minutos ± 5 minutos |
| Passo 13 | Repita os passos 8-10 |
| Passo 14 | Adicione 100 µL do Substrato (5) em cada micro-poço. Inicie um cronômetro de 30 minutos quando o substrato (5) for adicionado ao primeiro micro-poço. Repita o passo 6 após adicionar substrato a todos os micro-poços (5) |
| Passo 15 | Incube a placa em 37±1°C pelo restante dos 30 minutos (±1 minuto) cronometrados no passo 15. |
| Passo 16 | Adicione 100 µL da Solução de Parada (6) em cada micro-poço na mesma ordem que no passo 15 |
| Passo 17 | Leia a placa e recorde os resultados (OBSERVAÇÃO: A leitura deve ser feita dentro de 15 minutos) |

TABELA A: REAGENTES DA CURVA PADRÃO

| Frasco | Padrão (ng/mL) | Volume do Padrão | Volume do Tampão 1X (2) |
|--------|----------------|------------------|-------------------------|
| A | 25 | 250 µL (3) | 750 µL |
| B | 12.5 | 500 µL Frasco A | 500 µL |
| C | 6.25 | 500 µL Frasco B | 500 µL |
| D | 3.1 | 500 µL Frasco C | 500 µL |
| E | 1.6 | 500 µL Frasco D | 500 µL |
| F | 0.8 | 500 µL Frasco E | 500 µL |
| G | 0.4 | 500 µL Frasco F | 500 µL |

TABELA B: REAGENTES DO CORTE BASEADO NO CALIBRADOR

| Frasco | Calibrador (ng/mL) | Volume do Padrão | Volume do Tampão 1X (2) |
|--------|--------------------|------------------|-------------------------|
| A | 25 | 250 µL (3) | 750 µL |
| B | 12.5 | 500 µL Frasco A | 500 µL |

INTERPRETANDO O TESTE

- A. Misture gentilmente batendo levemente na lateral da placa ou mexendo a placa em um balcão por 1-5 segundos.
- B. Cuidadosamente, seque a parte de baixo dos micro-poços com um tecido sem fiapos e meça a absorvância de cada micro-poço de acordo com o procedimento listado na próxima página:
 - 1. Uma leitora de dois comprimentos de onda é necessária, com leitura em absorvâncias em 450 nm e 620/630nm. O branco deve ser marcado no Tampão de Lavagem 1X (2). Este teste não foi validado em leitoras de 1 comprimento de onda.
- C. Descarte os materiais utilizados no teste como resíduos perigosos e guarde a placa de testes vazia (sem micro-poços)
- D. Desinfete a placa de testes com um desinfetante equivalente a:
 - 1. Uma solução de 10% de cloro
 - 2. Etanol 70%
 - 3. 1% Lysol I.C.™

Observação: Se qualquer tipo de automação for utilizado no procedimento do teste, contate o fabricante do equipamento para mais instruções.

CONTROLE DE QUALIDADE & RESULTADOS

A. Os controles de qualidades e resultados são específicos para o procedimento que foi utilizado no teste. O método para controle de qualidade e cálculo de resultados **deve** ser o mesmo que o procedimento utilizado durante o teste.

B. PROCEDIMENTO DE CURVA PADRÃO

| PADRÃO | VALORES ACEITÁVEIS |
|--------------------------|---|
| 25 | 1.100 - 2.100 DO Anulada |
| 12.5 | 0.550 - 1.050 DO Anulada |
| 6.25 | 0.275 - 0.525 DO Anulada |
| 3.1 | 0.138 - 0.263 DO Anulada |
| 1.6 | 0.069 - 0.131 DO Anulada |
| 0.8 | 0.034 - 0.066 DO Anulada |
| 0.4 | 0.011 - 0.033 DO Anulada |
| PC | 4.0 - 7.0 ng/mL |
| NC | < 0.2 ng/mL |
| Tampão de Lavagem 1x (2) | DO Crua/Natural < 0.120 |
| R ² | ≥ 0.990 ajuste curva de quatro parâmetros |

| RESULTADOS | CONCENTRAÇÃO |
|------------|--------------|
| Negativo | < 0.20 ng/mL |
| Positivo | ≥ 0.20 ng/mL |

1. Controle de Qualidade:

Um teste é considerado válido quando os padrões, controle positivo, controle negativo, e R2 estão dentro dos intervalos aceitáveis de acordo com a tabela acima.

O controle positivo, controle negativo, e padrões devem ser incluídos com cada série de amostras de pacientes para garantir a qualidade dos reagentes. Os controles positivo e negativo servem como monitoramento de possível falha dos reagentes. O controle positivo não deve ser utilizado como um indicador de precisão dos padrões, e somente como garantia de funcionamento dos reagentes.

Se a concentração do controle positivo e/ou negativo não se enquadra nos parâmetros acima, os resultados das amostras de pacientes devem ser considerados inválidos e o teste deve ser repetido.

Controles adicionais podem ser testados de acordo com as orientações ou requisitos das regulações locais, estaduais ou federais.

2. Resultados:

Calcule a concentração (ng/ml) de acordo com os passos abaixo:

- i. Calcule o valor médio de cada ponto da curva padrão
- ii. Plote os valores da curva padrão utilizando a seguinte tabela:

| ng/mL (Eixo-X) | ABSORBÂNCIA (EIXO-Y) |
|----------------|------------------------------------|
| 25 | Média dos micro-poços (25 ng/mL) |
| 12.5 | Média dos micro-poços (12.5 ng/mL) |
| 6.25 | Média dos micro-poços (6.25 ng/mL) |
| 3.1 | Média dos micro-poços (3.1 ng/mL) |
| 1.6 | Média dos micro-poços (1.6 ng/mL) |
| 0.8 | Média dos micro-poços (0.8 ng/mL) |
| 0.4 | Média dos micro-poços (0.4 ng/mL) |

- iii. Utilizando um software de espectrofotômetro, calcule um ajuste de curva de 4 parâmetros:

$$\text{Concentração} = C \left[\frac{(A - D)}{(DO \text{ Anulada} - D)} - 1 \right]^{(1/B)}$$

- iv. Para calcular a concentração das amostras de pacientes, substitua o valor de absorvância (DO Anulada). Veja Abaixo:

EXEMPLO DE RESULTADOS E CÁLCULO*:

| PARAMETROS DO AJUSTE DE CURVA | CALCULATED VALUES |
|-------------------------------|-------------------|
| A | -0.019 |
| B | 0.964 |
| C | 496 |
| D | 47.3 |

Utilizando a equação de curva padrão acima, para uma amostra que gera uma DO anulada de 0.0695, a concentração seria calculada da seguinte maneira:

$$\text{Concentração} = C \left[\frac{(A - D)}{(DO \text{ Anulada} - D)} - 1 \right]^{(1/B)}$$

$$\text{Concentração} = 496 \left[\frac{(-0.019 - 47.3)}{(0.695 - 47.3)} - 1 \right]^{(1/0.964)} = 6.501 \text{ ng/ml}$$

*Os números acima são somente exemplos para propósito de demonstração. Não utilize esses números para o seu cálculo.

C. PROCEDIMENTO DE CORTE BASEADO NO CALIBRADOR

| CONTROLE | VALORES ACEITÁVEIS |
|--------------------------|--------------------------|
| Padrão 12.5 | DO Anulada 0.640 – 1.000 |
| Controle Pos. | 3.0 - 7.0 Unidades EIA |
| Controle Neg. | <1.0 Unidades EIA |
| Tampão de Lavagem 1x (2) | DO Crua/Natural < 0.120 |

| RESULTADOS | UNIDADES EIA |
|------------|--------------------|
| Negativo | <1.0 Unidades EIA |
| Positivo | ≥ 1.0 Unidades EIA |

1. Controle de Qualidade:

Um teste é considerado válido quando o calibrador 12.5ng/mL, o controle positivo e o negativo estão dentro dos intervalos aceitáveis de acordo com a tabela acima.

Os controles positivo e negativo, e o calibrador de 12.5ng/mL devem ser incluídos com cada série de amostras de pacientes para garantir a qualidade dos reagentes. Os controles positivo e negativo servem como monitoramento de possível falha dos reagentes. O controle positivo não deve ser utilizado como um indicador de precisão do calibrador, e somente como garantia de funcionamento dos reagentes.

Se as Unidades EIA do controle positivo e/ou negativo não se enquadra nos parâmetros acima, os resultados das amostras de pacientes devem ser considerados inválidos e o teste deve ser repetido.

Controles adicionais podem ser testados de acordo com as orientações ou requisitos das regulações locais, estaduais ou federais.

2. Resultados:

Calcule a concentração (Unidades EIA) de acordo com os passos abaixo:

- i. Calcule o valor médio para o calibrador de 12.5 ng/mL
- ii. Utilizando a equação abaixo, calcule as Unidades EIA da amostra

$$\text{Unidades EIA} = \left[\frac{\text{DO Anulada de Amostra}}{(\text{DO Anulada do Calibrador } 12.5)} \times 10 \right]$$

EXEMPLO:

$$\left[\frac{0.327}{0.812} \times 10 \right] = 4.03 \text{ Unidades EIA}$$

- iii. Utilizando a tabela acima, compare as Unidades EIA da amostra para determinar se o resultado é positivo ou negativo.

CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE

A. PROCEDIMENTO DE CURVA PADRÃO

1. Interferência:

O HGM201 teve o seu potencial de interferência avaliado com as seguintes condições de urina: Urina com sangue, Proteinúria, Muco, Cilindros na Urina, Células epiteliais na urina, Acetonúria e Bilirrubina. Essas amostras não demonstraram nenhuma interferência com o teste.

2. Reatividade Cruzada:

O HGM201 teve sua reatividade cruzada avaliada com um painel de diversas amostras de pacientes contendo uma variedade de patologias diferentes. Os resultados deste teste seguem na tabela abaixo:

| Patologia | Número de Amostras | % Positivo |
|---------------------------|--------------------|------------|
| <i>Paracoccidioides</i> * | 1 | 100% (1/1) |
| <i>Blastomyces</i> | 11 | 64% (7/11) |
| <i>Candida</i> | 10 | 10% (1/10) |
| <i>Coccidioides</i> | 9 | 0% (0/9) |
| <i>Aspergillus</i> | 8 | 0% (0/8) |
| <i>Cryptococcus</i> | 5 | 0% (0/5) |
| <i>Verticillium</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Mucormycosis</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Pneumocystis</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Malassezia</i> | 1 | 0% (0/1) |

**Indica que Antígenos de Imunodifusão foram utilizados na avaliação devido à falta de amostras de pacientes disponível para o teste de performance do teste*

3. Comparação de métodos:

O HGM201 foi comparado com o ALPHA Histoplasma EIA da IMMY (HAG102) em um estudo interno. Um total de 277 amostras de urina foram testadas nos dois testes de acordo com o procedimento dos seus respectivos folhetos informativos. A análise deste estudo foi feita para determinar o percentual de co-positividade e co-negatividade. Os resultados da análise seguem nas tabelas abaixo:

| | | IMMY HAG102 | |
|---------------------------------|------|----------------|------|
| | | Pos. | Neg. |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 48 | 35 |
| | Neg. | 10 | 184 |

| | Calculated | 95% CI |
|----------------------|------------|-------------|
| % Positive Agreement | 82.76% | 70.6%-91.4% |
| % Negative Agreement | 84.02% | 79.5%-88.6% |

Embora a comparação com HAG102 resultou em 35 resultados “falso-positivos” no HGM201, após uma análise mais profunda das amostras utilizadas, foi concluído que 27 destas eram casos confirmados de histoplasmose. Dentre os 8 “falso-positivos” que não eram casos confirmados, 6 eram casos de blastomicose confirmados por cultura microbiológica, organismo que demonstrou reatividade cruzada com o teste (HGM201). A tabela abaixo demonstra a co-positividade e co-negatividade excluindo estes casos:

| | | IMMY HAG102 | | | Calculated | 95% CI |
|---------------------------------|------|----------------|------|-------------------------|------------|-------------|
| | | Pos. | Neg. | | | |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 48 | 2 | % Positive Agreement | 82.76% | 70.6%-91.4% |
| | Neg. | 10 | 185 | % Negative Agreement | 98.92% | 96.2%-99.9% |

4. Precisão:

A precisão (reprodutibilidade) do HGM201 foi avaliada na IMMY. Um painel de cinco amostras foi testado no HGM201 junto com os padrões e controles necessários seguindo o documento de orientação CLSI EP17-A como referência. Foram testados diariamente por 5 dias as seguintes amostras: os padrões, três urinas de controle de qualidade (Positiva Alta, Positiva Média e Positiva Baixa), e duas urinas negativas.

Como análise dos resultados, foram calculados a média, o desvio padrão, e o coeficiente de variação percentual baseado na concentração.

| Concentração | | | |
|----------------------|--------|------------------|------------------------------|
| | Média | Desvio Padrão | % Coeficiente de Variação |
| Urina Positiva Alta | 26.398 | 1.179 | 4.466 |
| Urina Positiva Média | 7.156 | 0.308 | 4.298 |

| Concentração | | | |
|----------------------|-------|-------|--------|
| Urina Positiva Baixa | 1.262 | 0.154 | 12.165 |
| Urina Neg. 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Urina Neg. 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Controle Pos. | 5.557 | 0.387 | 6.961 |
| Controle Neg. | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

B. PROCEDIMENTO DE CORTE BASEADO NO CALIBRADOR

1. Interferência:

O HGM201 teve o seu potencial de interferência avaliado com as seguintes condições de urina: Urina com sangue, Proteinúria, Muco, Cilindros na Urina, Células epiteliais na urina, Acetonúria e Bilirrubina. Essas amostras não demonstraram nenhuma interferência com o teste.

2. Reatividade Cruzada:

O HGM201 teve sua reatividade cruzada avaliada com um painel de diversas amostras de pacientes contendo uma variedade de patologias diferentes. Os resultados deste teste seguem na tabela abaixo:

| Patologia | Número de Amostras | % Positivo |
|---------------------------|--------------------|------------|
| <i>Paracoccidioides</i> * | 1 | 100% (1/1) |
| <i>Blastomyces</i> | 11 | 55% (6/11) |
| <i>Candida</i> | 10 | 0% (0/10) |
| <i>Coccidioides</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Aspergillus</i> | 8 | 0% (0/8) |
| <i>Cryptococcus</i> | 5 | 0% (0/5) |
| <i>Verticillium</i> | 1 | 0% (0/1) |

| Patologia | Número de Amostras | % Positivo |
|---------------------|--------------------|------------|
| <i>Mucormycosis</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Pneumocystis</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Malassezia</i> | 1 | 0% (0/1) |

**Indica que Antígenos de Imunodifusão foram utilizados na avaliação devido à falta de amostras de pacientes disponível para o teste de performance do teste*

3. Comparação de métodos

O HGM201 foi comparado com o ALPHA Histoplasma EIA da IMMY (HAG102) em um estudo interno. Um total de 277 amostras de urina foram testadas nos dois testes de acordo com o procedimento dos seus respectivos folhetos informativos. A análise deste estudo foi feita para determinar o percentual de co-positividade e co-negatividade. Os resultados da análise seguem nas tabelas abaixo:

| | | IMMY HAG102 | |
|---------------------------------|------|----------------|------|
| | | Pos. | Neg. |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 47 | 31 |
| | Neg. | 11 | 188 |

| | Calculated | 95% CI |
|----------------------|------------|---------------|
| % Positive Agreement | 81.03% | 68.59%-90.13% |
| % Negative Agreement | 85.84% | 80.51%-90.18% |

Embora a comparação com HAG102 resultou em 31 resultados “falso-positivos” no HGM201, após uma análise mais profunda das amostras utilizadas, foi concluído que 25 destas eram casos confirmados de histoplasmose. Dentre os 6 “falso-positivos” que não eram casos confirmados, 5 eram casos de Blastomicose confirmados por cultura microbiológica, organismo que demonstrou reatividade cruzada com o teste (HGM201). As tabelas abaixo demonstram a co-positividade e co-negatividade excluindo estes casos:

| | | IMMY HAG102 | | | Calculated | 95% CI |
|---------------------------------|------|----------------|------|-------------------------|------------|---------------|
| | | Pos. | Neg. | | | |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 47 | 1 | % Positive Agreement | 81.03% | 68.59%-90.13% |
| | Neg. | 11 | 188 | % Negative Agreement | 99.47% | 97.47%-99.99% |

4. Precisão:

A precisão (reprodutibilidade) do “clarus Histoplasma Galactomannan EIA” foi avaliada na IMMY. Um painel de cinco amostras foi testado no HGM201 junto com os padrões e controles necessários seguindo o documento de orientação CLSI EP17-A como referência. Foram testados diariamente por 5 dias as seguintes amostras: os padrões, três urinas de controle de qualidade (Positiva Alta, Positiva Média e Positiva Baixa), e duas urinas negativas.

Como análise dos resultados, foram calculados a média, o desvio padrão, e o coeficiente de variação percentual baseado na concentração:

| Concentração | | | |
|----------------------|--------|------------------|------------------------------|
| | Média | Desvio Padrão | % Coeficiente de Variação |
| Urina Positiva Alta | 24.436 | 0.712 | 2.9% |
| Urina Positiva Média | 5.164 | 0.292 | 5.6% |
| Urina Positiva Baixa | 0.731 | 0.097 | 13.2% |
| Urina Neg. 1 | -0.235 | 0.036 | -15.3% |
| Urina Neg. 2 | -0.227 | 0.053 | -23.3% |
| Controle Pos. | 3.813 | 0.322 | 8.5% |
| Controle Neg. | -0.098 | 0.047 | -48.3% |

LIMITAÇÕES

- O HGM201 é destinado ao uso com amostras de urina. A performance deste teste com outros tipos de amostras ainda não foi estabelecida.
- Somente o volume necessário para a realização da quantidade de micro-poços sendo utilizada no dia de teste deve ser aquecida a temperatura ambiente. A performance dos reagentes não foi determinada caso o reagente seja exposto a flutuações na temperatura.
- Um resultado negativo não descarta o diagnóstico de histoplasmose.
- O “clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA” exibe reatividade cruzada com *Paracoccidioides*, e *Blastomyces*, e algumas espécies de cândida. Resultados positivos devem ser confirmados em áreas ou grupo de pacientes onde esses organismos são endêmicos.
- O HGM201 não é destinado para monitoramento de terapia/tratamento.
- Lavagem inadequada da placa durante o procedimento do teste pode causar excesso de reatividade de fundo.
- Utilize somente o protocolo descrito neste folheto informativo. Duração de incubação e/ou temperatura diferente daquelas listadas neste folheto podem gerar resultados errôneos.
- A performance do “clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA” não foi estabelecida para leitura manual e/ou determinação de resultado por métodos visuais.
- Esse teste não deve ser utilizado como um procedimento de triagem para a população de maneira generalizada. O valor preditivo de um resultado serológico positivo ou negativo, depende na probabilidade de existência de histoplasmose antes do teste.
- Contaminação do poço contendo amostra de um paciente negativo é possível através de respingos oriundos de um poço contendo controle positivo ou uma amostra positiva. Este

acontecimento é comum em casos de uso de técnicas de pipetagem inadequadas ou por manipulação brusca da placa de teste.

- Apesar do “clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA” não ter sido testado para a reatividade cruzada com *Talaromyces marneffe*, a reatividade cruzada com tal organismo já foi experienciada em anticorpos de *Histoplasma*.
- A performance do “clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA” é desconhecida quando a amostra sendo testada contém as seguintes substâncias: comidas que resultam na coloração da urina, creme vaginal, cafeína, ácido ascórbico, Itraconazol, Anfotericina B., Acetaminofeno, ou ácido acetilsalicílico.
- Resultados de testes diagnósticos de *Histoplasma capsulatum* não podem ser comparados.












INFORMAÇÃO DE RISCOS E ADVERTÊNCIAS

Para mais informações sobre perigos e riscos, consulte a Ficha de dados de Segurança (Safety Data Sheet).

SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

| PROBLEMA | SOLUÇÃO |
|--|---|
| Variação entre resultados de réplicas da mesma amostra | <ul style="list-style-type: none">• Prepare os padrões, controles, e amostras em uma placa de 96 micro-poços novo, limpo, e sem anticorpos/antígenos imobilizados aos micro-poços.• Use uma pipeta multicanal para transferir os conteúdos da placa de 96 micro-poços (1) para a placa de testes do kit HGM201 |
| Suspeita de contaminação dos micro-poços | <ul style="list-style-type: none">• Bata gentilmente na lateral da placa para misturar os reagentes e evitar respingos.• Tome cuidado ao pipetar para evitar respingos, e transferência de micro-poços adjacentes.• Troque ponteiras das pipetas a cada micro-poço |
| Falha da curva padrão | <ul style="list-style-type: none">• Tome cuidado ao preparar os padrões: misture com o vórtice entre diluições, utilize técnicas precisas e cuidadosas ao pipetar, e troque a ponteira da pipeta entre cada diluição. |
| DO abaixo do esperado (Reagentes muito gelados na hora do teste) | <ul style="list-style-type: none">• Certifique-se de que todos os reagentes estão à 20-25°C antes de iniciar o teste.• Armazene os reagentes em um ambiente com controle de temperatura (por exemplo, uma incubadora configurada a 25°C) quando estiver aquecendo os reagentes a 20-25°C |
| Efeito de Borda | <ul style="list-style-type: none">• O impacto do efeito de borda foi determinado como insignificante |
| Utilizando amostras diferentes de Urina | <ul style="list-style-type: none">• Este teste é somente para o uso com amostras de urina |

SÍMBOLOS

| | | | |
|---|--|---|--|
|  | Contém quantidade suficiente para XX determinações |  | Número de referência |
|  | Consulte as instruções de uso |  | Número de Lote |
|  | Fabricante |  | Para uso de diagnósticos in vitro |
|  | Data de Expiração |  | Representativo autorizado na comunidade Europeia |
|  | Limitações de Temperatura |  | Controle |
|  | Marca CE de conformidade | | |

ESPAÑOL

TABLE OF CONTENTS

| | |
|---|-------|
| USO PREVISTO | 49 |
| RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA | 49 |
| PRINCIPIO BIOLÓGICO | 50 |
| EXPLICACIÓN DE LOS DOS PROCEDIMIENTOS | 50 |
| REACTIVOS | 51 |
| MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS | 52 |
| ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES | 53 |
| RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES | 53 |
| PROCEDIMIENTO | 54-55 |
| LECTURA DE LA PRUEBA | 56 |
| CONTROL DE CALIDAD & RESULTADOS | 57-61 |
| <i>PROCEDIMIENTO DE LA CURVA ESTÁNDAR</i> | 57-59 |
| <i>PROCEDIMIENTO DEL PUNTO DE CORTE DEL CALIBRADO</i> | 60-61 |
| CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO | 61-66 |
| <i>PROCEDIMIENTO DE LA CURVA ESTÁNDAR</i> | 61-64 |
| <i>PROCEDIMIENTO DEL PUNTO DE CORTE DEL CALIBRADO</i> | 64-66 |
| LIMITACIONES | 67 |
| INFORMACIÓN SOBRE ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES | 68 |
| SOLUCIÓN DE PROBLEMAS | 68-69 |
| SÍMBOLOS | 70 |
| BIBLIOGRAFÍA | 71 |

USO PREVISTO

La prueba clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA (HGM201) es un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich en microplaca para la detección cualitativa de *Histoplasma* Galactomannano en muestras de orina. Cuando esta prueba es utilizada con otros procedimientos de diagnóstico como cultivo microbiológico, análisis histológico de muestras de biopsia y evidencias radiográficas, puede ser utilizada como ayuda en el diagnóstico de histoplasmosis.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Histoplasma capsulatum (*H. capsulatum*) es hongos dimórficos patógenos con distribución mundial. Es endémico a las cuencas de los ríos Ohio y Misisipí, en los Estados Unidos y algunas regiones de América Central y Sur.¹ La Histoplasmosis es causada por la inhalación de las esporas del hongo. Típicamente, se encuentra en el suelo contaminado con excrementos de aves o murciélagos. Es una de las micosis más frecuentes en el mundo, con más de 100,000 casos de histoplasmosis diseminada en pacientes con VIH mundialmente cada año.² Los signos de infección suelen ser semejantes a los síntomas de los de una gripe, incluyendo fiebre, tos, fatiga, escalofríos, dolor de cabeza, molestia en el pecho, y/o dolor corporal. Los síntomas pueden aparecer entre 3 a 21 días después de haber sido expuesto al hongo.³ La detección de los anticuerpos de *H. capsulatum* por inmunodifusión y fijación del complemento son métodos serológicos usados como rápidas alternativas a las técnicas microbiológicas.³

El aislamiento de *H. capsulatum* por cultivo de muestras clínicas sigue siendo el diagnóstico definitivo de histoplasmosis.^{4,3} Sin embargo, el cultivo de los organismos requiere de un periodo de incubación de dos a cuatro semanas para que el hongo pueda ser identificado.⁵ Un enfoque más racional para el diagnóstico de la histoplasmosis y el seguimiento de los pacientes, puede ser la detección rápida de *H. capsulatum* (específicamente Galactomannano) en orina.⁶ Los anticuerpos monoclonales usados para la detección en este kit, han mostrado utilidad clínica en el diagnóstico de histoplasmosis en pacientes.^{5,7}

PRINCIPIO BIOLÓGICO

HGM201 es un ensayo inmunoenzimático tipo sándwich en microplaca para la detección de *Histoplasma* Galactomanano en muestras de orina. El galactomanano es un polisacárido que se encuentra en la pared celular. Los anticuerpos monoclonales de Anti-*Histoplasma* IgG son utilizados para recubrir los pocillos de las microplacas y poder capturar los anticuerpos. Así mismo, peroxidasa de rábano (PHR) conjugada con anticuerpos monoclonales de anti-*Histoplasma* IgG son usados para detectar los reactivos. Los especímenes de orina, sin algún pretratamiento, se añaden a los micropocillos que están cubiertos con los anticuerpos y se incuban.

Si el espécimen del paciente contiene *Histoplasma* Galactomanano es reconocido y capturado por los anticuerpos, y esos antígenos se unirán a los micropocillos. Después del periodo de incubación, los micropocillos son lavados para eliminar cualquier material que no se haya unido. Así mismo, anticuerpos detectores de peroxidasa de rábano (PHR) es añadida a los micropocillos. Después del segundo periodo de incubación, los micropocillos son lavados nuevamente para remover cualquier anticuerpo de PHR que no se haya unido. Si algún antígeno está presente en el espécimen del paciente, se forma una solución de color azul al añadir 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB). La reacción es interrumpida con la adición de la Solución de Interrupción, donde un color amarillo se forma. Se determina la densidad óptica (absorbancia) con un lector de microplacas a 450 nm y una longitud de onda de referencia de 620/630 nm.

EXPLICACIÓN DE LOS DOS PROCEDIMIENTOS

La prueba HGM201 tiene dos métodos para obtener resultados con muestras de orina, utilizando la Curva Estándar y el procedimiento utilizando el Punto de Corte del Calibrador. El usuario debe de determinar el procedimiento que va a ser utilizado antes de empezar la prueba.

El procedimiento utilizando la Curva Estándar permite obtener una mejor sensibilidad del espécimen del paciente al utilizar 7 estándares, creados por el usuario, un control positivo, un control negativo, y un blanco. Los resultados obtenidos son en ng/mL.

El procedimiento utilizando el Punto de Corte del Calibrador, utiliza menos micropocillos al utilizar solo un estándar, creado por el usuario, un control positivo, un control negativo, y un blanco. Sin embargo, se sensibilidad es reducida. Los resultados obtenidos son en unidades de EIA.⁸

REACTIVOS

| REACTIVO | # de Referencia | Cantidad | DESCRIPCIÓN | Símbolo en la Etiqueta | Símbolos de Advertencias |
|------------------|-----------------|----------|--|------------------------|---|
| Microwell Plate | HGMMW2 | 96 c/u | Placa stripwell con micropocillos de poliestireno separables. Los micropocillos están recubiertos con anticuerpos monoclonales de anti- <i>Histoplasma</i> . | 1 | N/A |
| 20X Wash Buffer | EIAWB1 | 50 mL | Solución de lavado concentrada conteniendo un preservante. | 2 | N/A |
| Standard | HGM100 | 3 mL | <i>Histoplasma</i> galactomanano de un cultivo filtrado diluido en una solución de proteína tamponada a 100 ng/mL conteniendo un preservante. | 3 | N/A |
| Positive Control | HGMPC2 | 1 mL | <i>Histoplasma</i> Galactomanano en una solución de proteína tamponada conteniendo un preservante. | + | N/A |
| Negative Control | HGMNC2 | 1 mL | Solución de proteína tamponada conteniendo un preservante. | - | N/A |
| Conjugate | HGMDA2 | 10 mL | Solución de HRP-conjugada con anticuerpos monoclonales de anti- <i>Histoplasma</i> IgG, tamponada conteniendo un preservante. | 4 | N/A |
| TMB Substrate | EIATUS | 10 mL | Solución tamponada conteniendo tetrametilbenzidina (TMB). | 5 | N/A |
| Stop Solution | EIASS2 | 10 mL | Solución de ácido metanosulfónico. ADVERTENCIA: Puede ser corrosivo a metales. H290, P234, P390, P406. | 6 |  |

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

- Todo el kit HGM201 debe de ser almacenado a 2-8°C, hasta la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas. Todos los reactivos deben de ser refrigerados inmediatamente después de su uso.
- Los micropocillos sin utilizar (1) deben almacenarse y sellarse inmediatamente después de abrir a 2-8°C en las bolsas Mylar® resellables. Se debe de tener cuidado de asegurarse que el desecante permanezca en la bolsa con los micropocillos no utilizados.
- Evite la exposición prolongada del Sustrato de TMB (5) a la luz.
- Después de su preparación, la Solución de Lavado puede ser usada por 30 días si es almacenada a 2-8°C cuando no está en uso. En cada uso, los componentes del kit deben ser inspeccionados por signos de contaminación.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todo el kit, incluyendo las microplacas, deben de estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes y durante su uso. Prepare una solución de 1x de solución de lavado mezclando 19 partes de agua destilada y una parte se la solución de lavado 20x (2).

**Consulte la HDS para más información sobre las advertencias de los reactivos.*

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- A. Pipeta(s) capaces de medir y dispensar de 100-500 µL, y sus puntas desechables
- B. Agua destilada o desionizada
- C. Lector de microplacas capaz de leer absorbancias de 450 nm y 620/630 nm con software capaz de generar un ajuste de curva de cuatro parámetros
- D. Lavador de microplacas o una pipeta multicanal para lavado
- E. Temporizador
- F. Agitador tipo vórtex
- G. Incubadora a 37 °C (±1°C)
- H. Probeta para diluir la solución de lavado

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- A. La estandarización específica es necesaria para producir nuestros reactivos y materiales de alta calidad. IMMY no puede garantizar el desempeño de los productos si son usados con materiales de otros fabricantes. No intercambie reactivos de un kit con un número de lote diferente u otros fabricantes.
- B. El usuario asume completa responsabilidad por cualquier modificación al procedimiento publicado aquí.
- C. Evite el contacto con la Solución de Interrupción (ácido metanosulfónico). Si ocurre contacto con la piel o los ojos, lavar con abundante cantidad de agua.
- D. Evitar salpicaduras al dispensar los reactivos en los tubos o en los pocillos de la placa, ya que esto puede causar resultados erróneos.
- E. Si un buen lavado no es realizado puede causar una reactividad excesiva de fondo en cualquier protocolo de ELISA.
- F. Seguir solo los protocolos descritos en este prospecto. Los tiempos y temperaturas de incubación que no estén especificadas pueden dar resultados erróneos.
- G. Mantenga un patrón de técnicas de pipeteo adecuadas durante todo el procedimiento para garantizar resultados óptimos y reproducibles.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS ESPECÍMENES

Utilizando las técnicas establecidas por personal calificado, recolectar las muestras de forma aséptica. Al manipular muestras de pacientes, se debe de tomar las medidas adecuadas para prevenir la exposición a agentes etiológicos potencialmente presentes. No se ha evaluado la prueba con muestras distintas a la orina.

Los especímenes en tránsito entre laboratorios deben de mantenerse a una temperatura de 2-8°C. Sin embargo, si se produce un retraso en el procesamiento de la muestra, pueden ser almacenadas a 2-8°C por 72 horas o a -16 a -24°C por hasta dos semanas si es permitido. No obstante, una muestra con una concentración positiva muy baja puede volverse negativa después de haber sido almacenada.

Los especímenes deben de estar a temperatura ambiente (20-25°C) antes de utilizarse.

PROCEDIMIENTO

| | |
|--------|---|
| Paso 1 | Prepare suficientes alícuotas de los reactivos para las pruebas que se ejecutaran ese día. Regrese los reactivos sin utilizar a 2-8°C. <i>(NOTA: Cuando se estén haciendo las alícuotas del Sustrato de TMB (5), proteja el reactivo de la luz)</i> |
| Paso 2 | Todos los reactivos deben de estar a temperatura ambiente (20-25°C) |
| Paso 3 | Prepare los estándares para el procedimiento de la Curva Estándar (Tabla A) o el 12.5 ng/mL calibrador para el procedimiento del Punto de Corte del Calibrador (Tabla B). <i>(NOTA: Use el agitador tipo vórtex y una punta de pipeta nueva para cada vial antes de hacer cada dilución seriada.)</i> |
| Paso 4 | Remueva el número necesario de Micropocillos de Captura Recubiertos con Anticuerpos (1) para las muestras, los estándares, y los controles, e insertelos en un portaplacas. Prepare una tabla para la identificación de los especímenes de los pacientes y los controles en las microplacas. <i>(NOTA: Vuelva a colocar las tiras no utilizadas y selle la bolsa con el desecante. Almacenar a 2-8°C.)</i> |
| Paso 5 | Añada 100 µl de los siguientes reactivos a diferentes micropocillos: <ul style="list-style-type: none"> • Solución de Lavado 1x (2 diluida a 1X), esta solución servirá como el blanco • Control Positivo (+) • Control Negativo (-) • Estándares o Calibrador preparados en el paso 3 • Especímenes de los pacientes |
| Paso 6 | Homogenice agitando suavemente la placa en la mesa de laboratorio por 1-5 segundos |
| Paso 7 | Incuba la placa durante 60 minutos ±5 minutos a 37°C ±1°C. |
| Paso 8 | Aspire el contenido de todos los micropocillos con una pipeta, utilizando una punta nueva en cada micropocillo, y desechar en un recipiente de riesgo biológico. |
| Paso 9 | Lave todos los micropocillos con solución de lavado 1X (2 diluida a 1X), utilizando un lavador de microplacas o una pipeta multicanal e invierta la microplaca para eliminar los restos de líquido, utilizando una de las dos siguientes opciones: <ol style="list-style-type: none"> 1. Lavar todos los micropocillos con 370 µL de Solución de Lavado 1x y repita el lavado tres veces. 2. Lave todos los micropocillos con 300 µL de Solución de Lavado 1x y repita el lavado cinco veces. |

| | |
|---------|---|
| Paso 10 | Después del lavado final, golpear la placa invertida sobre un papel absorbente para eliminar cualquier exceso de Solución de Lavado 1x (2 diluida a 1X) en los micropocillos. |
| Paso 11 | Añada 100 µL del Conjugado (4) a cada micropocillo y repita el paso 6 después de que todos los micropocillos contengan (4) |
| Paso 12 | Incube la placa durante 45 minutos ±5 minutos a 37°C ±1°C. |
| Paso 13 | Repita los pasos 8-10. |
| Paso 14 | Añada 100 µL de Sustrato de TMB (5) a cada micropocillo. Inicie un temporizador por 30 minutos con la adición de 5 al primer micropocillo. Repita el Paso 6 después de que todos los micropocillos contengan 5. |
| Paso 15 | Incube la placa por los restantes 30 minutos (±1 minutos) del Paso 15 a 37°C ±1°C. |
| Paso 16 | Añada 100 µL Solución de Interrupción (6) a cada micropocillo en el mismo orden de la adición del paso 15. |
| Paso 17 | Lea y registre los resultados. (NOTA: La microplaca se debe de leer antes de que transcurran 15 minutos de la adición de la solución de interrupción.) |

TABLA A: REACTIVOS DE LA CURVA ESTÁNDAR

| Tubo | Estándar (ng/mL) | Volumen de Estándar | Volumen de 1X 2 |
|------|------------------|---------------------|-----------------|
| A | 25 | 250 µL 3 | 750 µL |
| B | 12.5 | 500 µL Tubo A | 500 µL |
| C | 6.25 | 500 µL Tubo B | 500 µL |
| D | 3.1 | 500 µL Tubo C | 500 µL |
| E | 1.6 | 500 µL Tubo D | 500 µL |
| F | 0.8 | 500 µL Tubo E | 500 µL |
| G | 0.4 | 500 µL Tubo F | 500 µL |

TABLA B: REACTIVOS DEL PUNTO DE CORTE DEL CALIBRADOR

| Tubo | Calibrador (ng/mL) | Volumen de Estándar | Volumen de 1X 2 |
|------|--------------------|---------------------|-----------------|
| A | 25 | 250 µL 3 | 750 µL |
| B | 12.5 | 500 µL Tubo A | 500 µL |

LECTURA DE LA PRUEBA

- A. Homogenice agitando suavemente la placa en la mesa de laboratorio por 1-5 segundos.
- B. Limpie cuidadosamente el fondo de la placa con un pañuelo limpio y libre de polvo. Lea la densidad óptica de los micropocillos como se muestra en la siguiente página.
 1. Se requiere de un lector de microplacas de longitud de onda dual con absorbancias calibrado a 450 nm y 620/630 nm. El blanco debe de ser el micropocillo que contenga 1x Solución de Lavado (1X 2). Este ensayo no ha sido validado con un lector de microplacas de longitud de una onda.
- C. Elimine los materiales utilizados como si fuesen residuos peligrosos biológico-infecciosos. Desinfecte y guarde el portaplacas.
- D. Los desinfectantes que pueden usarse para el protaplacas incluyen:
 1. Una solución de lejía al 10%
 2. Etanol al 70%
 3. Una desinfectante marca Lysol I.C. TM al 1%.

Nota: Si se está utilizando alguna automatización para ejecutar la prueba, comuníquese con el fabricante del equipo para más instrucciones.

CONTROL DE CALIDAD & RESULTADOS

A. Los resultados y los valores del Control de Calidad para cada prueba **no** pueden ser intercambiales con otras diferentes tipos o procedimientos pruebas.

B. PROCEDIMIENTO DE LA CURVA ESTÁNDAR

| ESTÁNDAR | CRITERIOS DE VALIDEZ |
|---------------------------|--|
| 25 | DO ajustada 1.100 – 2.100 |
| 12.5 | DO ajustada 0.550 – 1.050 |
| 6.25 | DO ajustada 0.275 - 0.525 |
| 3.1 | DO ajustada 0.138 - 0.263 |
| 1.6 | DO ajustada 0.069 - 0.131 |
| 0.8 | DO ajustada 0.034 - 0.066 |
| 0.4 | DO ajustada 0.011 - 0.033 |
| Control Positivo | 4.0 - 7.0 ng/mL |
| Control Negativo | < 0.2 ng/mL |
| Solución de Lavado 1X (E) | Señal Cruda < 0.120 |
| R ² | ≥ 0.990 usando un ajuste de curva de cuatro parámetros |

| RESULTADOS | CONCENTRACIÓN |
|------------|---------------|
| Negativo | <0.20 ng/mL |
| Positivo | ≥ 0.20 ng/mL |

1. Control de Calidad:

La prueba es considerada valida cuando los Estándares, Control Positivo (PC), Control Negativo (NC), y la R2 se encuentran dentro de los parámetros aceptables como se definen en las tablas anteriores.

El Control Positivo, Control Negativo, y los estándares deben de ser analizados con cada muestra de pacientes para proporcionar una garantía de la calidad de los reactivos. Los Controles Positivos y Negativos son destinados para monitorear una falla sustancial de los reactivos. El Control Positivo no debe de ser usado como un indicador de precisión de los estándares, solo asegura la funcionalidad de los reactivos.

Si la concentración de los Controles Positivo y/o Negativo no cumple con estos parámetros los resultados del paciente se deben considerar inválidos, y el ensayo deberá repetirse.

Se podrán utilizar controles adicionales según las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales, y/o federales o de organizaciones acreditadas.

2. Resultados:

Calcule la concentración (ng/mL) de la siguiente manera:

- i. Calcule el valor promedio de los puntos de la curva estándar.
- ii. Grafique los valores de la curva estándar usando la siguiente tabla:

| ng/mL (eje-X) | ABSORBANCIA (EJE-Y) |
|---------------|--|
| 25 | Promedio de los micropocillos (25ng/mL) |
| 12.5 | Promedio de los micropocillos (12.5 ng/mL) |
| 6.25 | Promedio de los micropocillos (6.25 ng/mL) |
| 3.1 | Promedio de los micropocillos (3.1 ng/mL) |
| 1.6 | Promedio de los micropocillos (1.6ng/mL) |
| 0.8 | Promedio de los micropocillos (0.8ng/mL) |
| 0.4 | Promedio de los micropocillos (0.4ng/mL) |

iii. Usando el software del espectrofotómetro, calcule un ajuste de curva de cuatro parámetros.

$$\text{Concentración} = C \left[\frac{(A - D)}{(DO \text{ Ajustada} - D)} - 1 \right]^{(1/B)}$$

iv. Las concentraciones del paciente son calculadas mediante la sustitución de los valores de absorbancia (DO ajustada). De la siguiente manera.

EJEMPLO DE LOS RESULTADOS Y VALORES CALCULADOS*:

| AJUSTE DE CURVA DE CUATRO PARÁMETROS | VALORES CALCULADOS |
|--------------------------------------|--------------------|
| A | -0.019 |
| B | 0.964 |
| C | 496 |
| D | 47.3 |

Utilizando la ecuación de la curva estándar mostrada anteriormente, para una muestra que tenga una absorbancia de DO ajustada de 0.695, la concentración se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Concentración} = C \left[\frac{(A - D)}{(DO \text{ Ajustada} - D)} - 1 \right]^{(1/B)}$$

$$\text{Concentración} = 496 \left[\frac{(-0.019 - 47.3)}{(0.695 - 47.3)} - 1 \right]^{(1/0.964)} = 6.501 \text{ ng/ml}$$

*Los valores presentados anteriormente solo son con objetivo de ejemplo, no los use para sus propios cálculos.

C. PROCEDIMIENTO DEL PUNTO DE CORTE DEL CALIBRADOR

| CONTROLES | CRITERIOS DE VALIDEZ |
|---------------------------|---------------------------|
| 12.5 estándar | DO ajustada 0.640 – 1.000 |
| Control Positivo | 3.0 - 7.0 Unidades de EIA |
| Control Negativo | <1.0 Unidades de EIA |
| Solución de Lavado 1X (2) | Señal Cruda < 0.120 |

| RESULTADOS | UNIDADES EIA |
|------------|--------------------|
| Negativo | <1.0 Unidades EIA |
| Positivo | ≥ 1.0 Unidades EIA |

1. Control de Calidad:

La prueba es considerada valida cuando el 12.5 ng/mL Punto de Corte del Calibrador (CC), Control Positivo (PC), y Control Negativo (NC) se encuentran dentro de los parámetros aceptables como se definen en las tablas anteriores.

El Control Positivo, Control Negativo, y el 12.5 ng/mL Punto de Corte del Calibrador (CC), deben de ser analizados con cada muestra de pacientes para proporcionar una garantía de la calidad de los reactivos.

Los Controles Positivos y Negativos son destinados para monitorear una falla sustancial de los reactivos. El Control Positivo no debe de ser usado como un indicador de precisión de los estándares, solo asegura la funcionalidad de los reactivos.

Si la concentración de los Controles Positivo y/o Negativo no cumple con estos parámetros los resultados del paciente se deben considerar inválidos, y el ensayo deberá repetirse.

Se podrán utilizar controles adicionales según las pautas o requisitos de las regulaciones locales, estatales, y/o federales o de organizaciones acreditadas.

2. Resultados:

Calcule la concentración (Unidades EIA) de la siguiente manera:

- i. Calcule el valor promedio de los puntos de la curva estándar.
- ii. Utilizando la siguiente ecuación, calcule las Unidades EIA de las muestras:

$$\text{Unidades EIA} = \left[\frac{\text{DO ajustada de la muestra}}{(\text{DO ajustada del estándar } 12.5)} \times 10 \right]$$

EJEMPLO:

$$\left[\frac{0.327}{0.812} \times 10 \right] = 4.03 \text{ Unidades EIA}$$

- iii. Utilizando la tabla previamente mencionada, compare las Unidades EIA de la muestra para determinar si es un valor positivo o negativo.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

A. PROCEDIMIENTO DE LA CURVA ESTÁNDAR

1. Interferencia:

HGM201 fue evaluada para la posibilidad de interferencia debido a las condiciones de la orina: orina con sangre, proteinuria, mucosa, yesos, células epiteliales en la orina, cetonuria, y bilirrubina. Estas muestras no mostraron interferencia en el ensayo.

2. Reactividad Cruzada :

HGM201 fue evaluada para determinar reactividad cruzada con un panel de especímenes de pacientes con diferentes patologías. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente tabla.

| Patología | Numero de especímenes | % Positivo |
|---------------------------|-----------------------|------------|
| <i>Paracoccidioides</i> * | 1 | 100% (1/1) |
| <i>Blastomyces</i> | 11 | 64% (7/11) |
| <i>Candida</i> | 10 | 10% (1/10) |
| <i>Coccidioides</i> | 9 | 0% (0/9) |
| <i>Aspergillus</i> | 8 | 0% (0/8) |
| <i>Cryptococcus</i> | 5 | 0% (0/5) |
| <i>Verticillium</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Mucormycosis</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Pneumocystis</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Malassezia</i> | 1 | 0% (0/1) |

*Indica el uso de una ID de antígeno, ya que no hay muestras de pacientes disponibles para las Características de Rendimiento

3. Método Comparativo :

Se realizaron pruebas comparativas entre HGM201 y HAG102, en nuestros laboratorios. Estos estudios se realizaron con un total de 277 especímenes de orina en ambas pruebas siguiendo los prospectos. El análisis de datos, para determinar el porcentaje de concordancia positiva y negativa, se muestra en la siguiente tabla.

| | | IMMY HAG102 | | Calculado | 95% CI | |
|---------------------------------|------|----------------|------|----------------------------|--------|-------------|
| | | Pos. | Neg. | | | |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 48 | 35 | % Concordancia Positiva | 82.76% | 70.6%-91.4% |
| | Neg. | 10 | 184 | % Concordancia Negativa | 84.02% | 79.5%-88.6% |

La comparativa resulto en 34 “falsos-positivos” en HGM201. Después de un análisis adicional en estos especímenes, se concluyó que 26 de ellos eran casos comprobados de histoplasmosis. De los 8 “falsos-positivos” que no fueron casos comprobados de histoplasmosis, 6 eran casos confirmados de cultivo de Blastomyces sp., que ha mostrado tener una reactividad cruzada con el ensayo. Las siguientes tablas muestran esta información:

| | | IMMY HAG102 | | Calculado | 95% CI |
|---------------------------------|------|----------------|------|----------------------------|-----------------------|
| | | Pos. | Neg. | | |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 48 | 2 | % Concordancia Positiva | 82.76% 70.6%-91.4% |
| | Neg. | 10 | 184 | % Concordancia Negativa | 98.92% 96.2%-99.9% |

4. Precisión:

Los estudios de precisión (reproducibilidad) de la prueba de HGM201 fue evaluado en IMMY analizando los estándares y un panel de cinco especímenes en HGM101 siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) EP-17A. Este panel de especímenes fue analizado diariamente por 5 días. Las muestras analizadas fueron las siguientes: estándares (preparadas siguiendo el prospecto), tres muestras de orina positivas (alta concentración positiva, moderada concentración positiva, y baja concentración positiva), y dos muestras de orina negativas.

Para precisión, la media, la desviación estándar, y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) fueron calculados para la señal cruda, DO ajustada, y las concentraciones. Los resultados se muestran en las siguientes tablas:

| Concentración | | | |
|---------------------------------|--------|-------|-------|
| | Media | DS | %CV |
| Alta Concentración Positiva | 26.398 | 1.179 | 4.466 |
| Moderada Concentración Positiva | 7.156 | 0.308 | 4.298 |

| Concentración | | | |
|-----------------------------|-------|-------|--------|
| Baja Concentración Positiva | 1.262 | 0.154 | 12.165 |
| Orina Negativa 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Orina Negativa 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Control Positivo | 5.557 | 0.387 | 6.961 |
| Control Negativo | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

B. PROCEDIMIENTO DEL PUNTO DE CORTE DEL CALIBRADOR

1. Interferencia:

HGM201 fue evaluada para la posibilidad de interferencia debido a las condiciones de la orina: orina con sangre, proteinuria, mucosa, yesos, células epiteliales en la orina, cetonuria, y bilirrubina. Estas muestras no mostraron interferencia en el ensayo.

2. Reactividad Cruzada :

HGM201 fue evaluada para determinar reactividad cruzada con un panel de especímenes de pacientes con diferentes patologías. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente tabla.

| Patología | Numero de especímenes | % Positivo |
|---------------------------|-----------------------|------------|
| <i>Paracoccidioides</i> * | 1 | 100% (1/1) |
| <i>Blastomyces</i> | 11 | 55% (6/11) |
| <i>Candida</i> | 10 | 0% (0/10) |
| <i>Coccidioides</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Aspergillus</i> | 8 | 0% (0/8) |
| <i>Cryptococcus</i> | 5 | 0% (0/5) |
| <i>Verticillium</i> | 1 | 0% (0/1) |
| <i>Mucormycosis</i> | 1 | 0% (0/1) |

| Patología | Numero de especímenes | % Positivo |
|---------------------|-----------------------|------------|
| <i>Pneumocystis</i> | 3 | 0% (0/3) |
| <i>Malassezia</i> | 1 | 0% (0/1) |

**Indica el uso de una ID de antígeno, ya que no hay muestras de pacientes disponibles para las Características de Rendimiento*

3. Método Comparativo

Se realizaron pruebas comparativas entre HGM201 y HAG102, en nuestros laboratorios. Estos estudios se realizaron con un total de 277 especímenes de orina en ambas pruebas siguiendo los prospectos. El análisis de datos, para determinar el porcentaje de concordancia positivos y negativo, se muestra en la siguiente tabla.

| | | IMMY HAG102 | |
|---------------------------------|------|----------------|------|
| | | Pos. | Neg. |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 47 | 31 |
| | Neg. | 11 | 188 |

| | Calculado | 95% CI |
|-------------------------|-----------|---------------|
| % Concordancia Positiva | 81.03% | 68.59%-90.13% |
| % Concordancia Negativa | 85.84% | 80.51%-90.18% |

La comparativa resulto en 31 “falsos-positivos” en HGM201. Después de un análisis adicional en estos especímenes, se concluyó que 25 de ellos eran casos comprobados de histoplasmosis. De los 6 “falsos-positivos” que no fueron casos comprobados de histoplasmosis, 5 eran casos confirmados de cultivo de *Blastomyces sp.*, que ha mostrado tener una reactividad cruzada con el ensayo. Las siguientes tablas muestran esta información:

| | | IMMY HAG102 | |
|---------------------------------|------|----------------|------|
| | | Pos. | Neg. |
| IMMY clarus HGM201 EIA | Pos. | 47 | 1 |
| | Neg. | 11 | 185 |

| | Calculado | 95% CI |
|-------------------------|-----------|---------------|
| % Concordancia Positiva | 81.03% | 68.59%-90.13% |
| % Concordancia Negativa | 99.47% | 97.47%-99.99% |

4. Precisión:

Los estudios de precisión (reproducibilidad) de la prueba de HGM201 fue evaluado en IMMY analizando los estándares y un panel de cinco especímenes en HGM101 siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) EP-17A. Este panel de especímenes fue analizado diariamente por 5 días. Las muestras analizadas fueron las siguientes: estándares (preparadas siguiendo el prospecto), tres muestras de orina positivas (alta concentración positiva, moderada concentración positiva, y baja concentración positiva), y dos muestras de orina negativas.

Para precisión, la media, la desviación estándar, y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) fueron calculados para la señal cruda, DO ajustada, y las concentraciones. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

| Concentración | | | |
|---------------------------------|--------|-------|--------|
| | Media | SD | %CV |
| Alta Concentración Positiva | 24.436 | 0.712 | 2.9% |
| Moderada Concentración Positiva | 5.164 | 0.292 | 5.6% |
| Baja Concentración Positiva | 0.731 | 0.097 | 13.2% |
| Orina Negativa 1 | -0.235 | 0.036 | -15.3% |
| Orina Negativa 2 | -0.227 | 0.053 | -23.3% |
| Control Positivo | 3.813 | 0.322 | 8.5% |
| Control Negativo | -0.098 | 0.047 | -48.3% |

LIMITACIONES

- La prueba HGM201 está diseñada para usarse solamente con especímenes de orina. Las características de desempeño de esta prueba no han sido evaluadas para otro tipo de especímenes.
- Solo permita que el volume necesario de reactivos requeridos para el numero de micropocillos que se va a utilizar para realizar la prueba alcance la temperatura ambiente. El rendimiento de los reactivos no ha sido determinado cuando son expuestos a fluctuaciones de temperatura.
- Los resultados negativos no excluyen el diagnóstico de histoplasmosis.
- Se encontró reactividad cruzada con la prueba HGM201 y *Paracoccidioides*, *Coccidioides*, *Candida* y *Blastomyces*. Los resultados positivos deben de confirmarse en áreas o grupos de pacientes donde estos organismos son endémicos o un riesgo.
- La prueba de HGM201 no debe de ser utilizada como terapia de monitoreo.
- Un lavado inadecuado puede causar un ruido excesivo de fondo.
- Seguir el procedimiento establecido en este prospecto. Los tiempos de incubación o las temperaturas que no sean especificadas pueden dar resultados erróneos.
- No se ha establecido el desempeño de la prueba HGM201 para la lectura manual y/o la determinación visual del resultado.
- Este ensayo no deberá realizarse como un procedimiento de evaluación para la población general. El valor predictivo de un resultado positivo o negativo depende de la posibilidad previa a la prueba de que la enfermedad de histoplasmosis esté presente.
- La contaminación de los pocillos de muestras de pacientes negativos por pocillos de muestras de control/paciente positivo es posible si el contenido de un pocillo se vierte en otro pocillo debido a una manipulación brusca de la microplaca o a una técnica de pipeteado deficiente cuando se añaden los reactivos.
- Aunque no fue evaluado en la prueba HGM201, se sabe que *Penicillium marneffe* presenta reactividad cruzada con anticuerpos *Histoplasma*.

- El desempeño de la prueba HGM201 se desconoce con muestras que incluyen las siguientes sustancias: alimentos que producen color en la orina, crema vaginal, cafeína, ácido ascórbico, itraconazol, anfotericina B., acetaminofén, o ácido acetilsalicílico.
- No se pueden comparar resultados entre diferentes ensayos de *Histoplasma capsulatum*.

INFORMACIÓN SOBRE ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES












Consulte la HDS para más información sobre las advertencias y precauciones.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

| PROBLEMA | SOLUCIÓN |
|--|--|
| Resultados variables a través de replicas | <ul style="list-style-type: none"> • Sitúe los estándares, controles, y muestras en una microplaca de 96 micropocillos, limpia y sin recubrimiento. • Utilice la pipeta multicanal para pipetear las sustancias antes mencionadas de la microplaca de 96 micropocillos a los micropocillos (1) |
| Sospecha de contaminación en los micropocillos | <ul style="list-style-type: none"> • Homogenice agitando suavemente la placa evitando salpicaduras • Tome precauciones al pipetear para asegurarse de que no haya salpicaduras o arrastre de muestras entre micropocillos • Utilice una punta de pipeta nueva para cada micropocillo |
| Falla en la curva estándar | <ul style="list-style-type: none"> • Tenga cuidado cuando esté preparando los estándares. Utilice el agitador tipo Vórtex entre diluciones, utilice técnicas de pipeteo precisas, y utilice una nueva punta de pipeta entre diluciones. |

| PROBLEMA | SOLUCIÓN |
|--|--|
| DO más baja de lo esperado (Reactivos demasiado fríos) | <ul style="list-style-type: none"> • Asegúrese que todos los reactivos estén a temperaturas entre 20-25°C antes de usar • Almacene los reactivos en un ambiente con temperatura controlada (ej.: incubadora de 25°C, antes y durante la prueba para asegurar que estén a temperatura ambiente) |
| ¿Efecto Borde? | <ul style="list-style-type: none"> • El efecto borde se encontró ser insignificante |
| ¿Utilizando muestras diferentes a la orina? | <ul style="list-style-type: none"> • Esta prueba solo es para muestras de orina |

SYMBOLS

| | | | |
|---|-----------------------------------|---|--|
|  | Suficiente para xxx de Pruebas |  | Numero de catálogo |
|  | Consulte las instrucciones de uso |  | Número de lote |
|  | Fabricante |  | Diagnóstico in vitro |
|  | Fecha de caducidad |  | Representante autorizado en la Comunidad Europea |
|  | Temperatura de conservación |  | Control |
|  | Conformidad europea | | |

BIBLIOGRAPHY/ BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA

1. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systematic fungal infections in Latin America. *Medical Mycology*. 2011;49(8):785-798.
2. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4):57.
3. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):115-32.
4. Haselow DT, Fields V, Fialkowski V, Gibbons-Burgener S, Jackson B, Pedati C, et al. Standardized surveillance case definition for histoplasmosis. Position Statement 16-ID-02: Council of State and Territorial Epidemiologists; 2016.
5. Theel ES, Harring JA, Dababneh AS, Rollins LO, Bestrom JE, Jespersen DJ. Reevaluation of commercial reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in urine. *J Clin Microbiol*. 2015;53(4):1198-203.
6. Azar MM, Hage CA. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(6):1612-1620.
7. Zhang X, Gibson B, Daly TM. Evaluation of commercially available reagents for diagnosis of histoplasmosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol*. 2013;51(12):4095-101.
8. Cáceres DH, Samayoá BE, Medina NG, Tobón AM, Guzmán BJ, Mercado D, Restrepo A, Chiller T, Arathoon EE, Gómez BL. 2018. Multicenter validation of commercial antigenuria reagents to diagnose progressive disseminated histoplasmosis in people living with HIV/ AIDS in two Latin American countries. *J Clin Microbiol* 56:e01959-17.

