

FRANÇAIS

CLARUS *HISTOPLASMA* GALACTOMANNAN EIA N° DE RÉF.: HGM201

UTILISATION PRÉVUE

Le clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA (N° DE RÉF. : HGM201) est un test immuno-enzymatique sur microplaque sandwich utilisé pour la détection qualitative du galactomannane d'*Histoplasma* dans des échantillons d'urine. Utilisé en conjonction avec d'autres procédures de diagnostic telles que la culture microbiologique, l'examen histologique d'échantillons de biopsie et les preuves radiographiques, ce test peut être utilisé comme une aide au diagnostic de l'histoplasmose.

Le clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA peut être utilisé manuellement ou sur des systèmes de microplaque automatisés. Ce test est destiné à être réalisé en laboratoire par des utilisateurs professionnels dûment formés.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Histoplasma capsulatum (*H. capsulatum*) est un champignon dimorphique pathogène présent dans le monde entier. Il est endémique dans les vallées de la rivière Ohio et du fleuve Mississippi aux États-Unis et dans certaines régions d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud.¹ L'histoplasmose est causée par l'inhalation du champignon. On trouve généralement ce champignon dans les sols contenant de grandes quantités d'excréments d'oiseaux ou de chauves-souris. C'est l'une des mycoses les plus fréquentes au monde, avec chaque année plus de 100 000 cas d'histoplasmose disséminée chez des patients atteints du SIDA dans le monde entier.² Les signes d'infection ressemblent souvent à des symptômes grippaux : fièvre, toux, fatigue, frissons, maux de tête, douleurs thoraciques et/ou courbatures. Les symptômes peuvent apparaître de 3 à 21 jours après l'exposition au champignon.³ La détection d'anticorps contre *H. capsulatum* par immunodiffusion et fixation du complément sont des méthodes sérologiques souvent utilisées pour offrir des alternatives rapides aux techniques microbiologiques.³

L'isolement par culture de *H. capsulatum* à partir d'échantillons cliniques reste le diagnostic définitif de l'histoplasmose.^{4,3} Cependant, la culture nécessite souvent une période d'incubation de deux à quatre semaines avant que l'identification du champignon ne soit possible.⁵ En outre, la sensibilité de la culture est très variable et la manipulation des isolats doit être effectuée dans des laboratoires BSL3. Une approche plus rationnelle du diagnostic de l'histoplasmose et du suivi des patients pourrait être la détection rapide de l'antigène de *H. capsulatum* (en particulier, le galactomannane) dans l'urine.⁶ Les anticorps monoclonaux utilisés pour la détection dans ce kit ont montré leur utilité clinique dans le diagnostic de l'histoplasmose chez les patients.^{5,7}

PRINCIPES BIOLOGIQUES

Le HGM201 est un test immuno-enzymatique sur microplaque sandwich qui détecte le galactomannane d'*Histoplasma* dans l'urine. Le galactomannane est un polysaccharide présent dans la paroi cellulaire du champignon. Des anticorps monoclonaux anti-*Histoplasma* IgG liés à des microplaques sont utilisés comme anticorps de capture. Les anticorps monoclonaux anti-*Histoplasma* IgG conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) sont utilisés comme réactifs de détection. Les échantillons d'urine sont analysés sans traitement. Les échantillons sont ajoutés aux micropuits recouverts des anticorps de capture et incubés.

Si l'échantillon du patient contient du galactomannane d'*Histoplasma*, ces antigènes deviennent liés aux anticorps de capture sur les micropuits. Après incubation, les micropuits sont lavés pour éliminer le matériel patient non lié. Les anticorps de détection HRP sont ajoutés aux micropuits. Après une seconde incubation, les micropuits sont lavés pour éliminer tout anticorps de détection HRP non lié. Si l'antigène est présent dans l'échantillon du patient, une couleur bleue se développe avec l'ajout de 3,3', 5,5' de TMB (tétraméthylbenzidine). La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'arrêt, où une coloration jaune se développe. La densité optique (absorbance) est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm et une longueur d'onde de référence de 620/630 nm.












EXPLICATION DES DEUX PROCÉDURES

Pour obtenir des résultats à partir d'échantillons d'urine, le test HGM201 offre deux méthodes : la procédure de courbe étalon (courbe d'ajustement à quatre paramètres ou ajustement linéaire) et la procédure de seuil de calibrateur. L'utilisateur doit déterminer la procédure à utiliser avant de commencer le test.



La procédure de courbe étalon permet d'obtenir une meilleure sensibilité de l'échantillon du patient. Elle utilise 7 étalons créés par l'utilisateur, un contrôle positif, un contrôle négatif et un blanc. Les résultats de la procédure sont exprimés en ng/ml.

La procédure du seuil de calibrateur utilise moins de micropuits en utilisant un calibrateur créé par l'utilisateur, un contrôle positif, un contrôle négatif et un blanc. Cependant, sa sensibilité est moindre. Les résultats de la procédure sont exprimés en unités EIA.⁸

RÉACTIFS FOURNIS

REACTIF	N° DE RÉF	QTÉ	DESCRIPTION	Symbole d'étiquette	Symbole de danger
Plaque de micropuits	HGMW2	96 chacune	Plaque de puits en bandes comportant des micropuits en polystyrène à séparation galvanique recouverts d'un anticorps monoclonal anti-Histoplasma.		S.O.
Tampon de lavage 20X	EIAWb1	50 ml	Tampon de lavage concentré contenant un conservateur.		S.O.
Étalon	HGM100	3 ml	<i>Histoplasma</i> galactomannane provenant d'un filtrat de culture dilué dans une solution protéique tamponnée à 100 ng/ml contenant un conservateur.		
Contrôle positif	HGMPC2	1 ml	<i>Histoplasma</i> galactomannane dans une solution protéique tamponnée contenant un conservateur.		
Contrôle négatif	HGMNC2	1 ml	Solution protéique tamponnée contenant un conservateur.		S.O.
Conjugué	HGMDA2	10 ml	Anticorps monoclonal anti- <i>Histoplasma</i> IgG conjugué au HRP dans une solution tampon contenant un conservateur.		S.O.
Substrat TMB	EIATUS	10 ml	Solution tamponnée contenant du TMB (tétraméthylbenzidine)		S.O.
Solution d'arrêt	EIASS2	10 ml	Acide méthanesulfonique.		

STOCKAGE ET STABILITE DES REACTIFS

- L'ensemble du kit de test HGM201 doit être conservé entre 2 et 8 °C jusqu'aux dates de péremption indiquées sur les étiquettes. Tous les réactifs doivent être ramenés entre 2 et 8 °C rapidement après utilisation.
- Les micropuits inutilisés () doivent être replacés dans le sac Mylar refermable, celui-ci scellé immédiatement après ouverture et stocké entre 2 et 8 °C. Des précautions doivent être prises pour s'assurer que la poche déshydratante reste dans le sac avec les micropuits inutilisés.
- Évitez une exposition prolongée du substrat TMB () à la lumière.
- Après préparation, un tampon de lavage peut être utilisé pendant 30 jours s'il est conservé entre 2 et 8 °C lorsqu'il n'est pas utilisé. Vérifiez toujours les signes évidents de contamination à chaque nouveau jour de test.

PREPARATION DES REACTIFS

REACTIF	N° DE RÉF	QTÉ	DESCRIPTION	Symbole d'étiquette	Symbole de danger
L'ensemble du kit, y compris la plaque de micropuits, doit être maintenu entre 20 et 25 °C avant et pendant l'utilisation. Préparez une solution 1X de tampon de lavage en mélangeant 19 volumes d'eau distillée ou déminéralisée avec 1 volume de tampon de lavage 20X (2).					

*Reportez-vous aux fiches de données de sécurité HGM201 pour plus d'informations sur les dangers et les avertissements.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- A. Pipettes capables de fournir des plages de 100 à 500 µl et embouts jetables
- B. Eau distillée ou déminéralisée
- C. Lecteur de microplaques capable de lire les absorbances à 450 et 620/630 nm avec un logiciel capable de générer une courbe d'ajustement à quatre paramètres ou un ajustement linéaire
- D. Laveur de plaque EIA ou pipette multicanal pour le lavage
- E. Minuteur
- F. Mélangeur vortex
- G. Incubateur réglé sur 37 °C (±1 °C)
- H. Cylindre gradué pour la dilution du tampon de lavage
- I. Réceptacle de déchets à risques biologiques

PRÉCAUTIONS CONCERNANT LES RÉACTIFS

- A. Une standardisation spécifique est nécessaire pour produire nos réactifs et matériaux de haute qualité.
- B. L'utilisateur assume l'entière responsabilité de toute modification des procédures publiées ici.
- C. N'utilisez pas le kit ou les réactifs du kit après la date de péremption indiquée.
- D. Au moment de chaque utilisation, les composants du kit doivent être inspectés visuellement pour détecter des signes évidents de contamination microbienne, de fuite ou de dommages physiques importants des micropuits. Le cas échéant, il convient de jeter la bandelette.
- E. IMMY ne peut garantir la performance de ses produits lorsqu'ils sont utilisés avec des matériaux achetés auprès d'autres fabricants. N'interchangez pas des réactifs provenant de numéros de lot de kits différents ou d'autres fabricants. L'utilisation d'autres produits avec ce test n'a pas été évaluée et peut entraîner des résultats erronés.
- F. Éviter tout contact avec la solution d'arrêt (acide méthanesulfonique). En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer immédiatement à grande eau.
- G. Les réactifs suivants sont étiquetés et présentent les dangers associés :

Pour les utilisateurs de l'Union européenne, l'étiquetage et les risques suivants s'appliquent :

Solution d'arrêt (N° de réf. : EIASS2)



DANGER

H314	Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires.
P260	Ne pas respirer le brouillard, les vapeurs ou les aérosols.
P264	Se laver soigneusement les mains, les avant-bras et le visage après manipulation.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage/auditive.
P303 + P361 + P353	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux), enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau.
P305 + P351 + P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX, rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte

	et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P310	Appeler immédiatement un centre antipoison ou un médecin.
P501	Éliminer le contenu/récipient conformément aux réglementations locales.

Standard (N° de réf. : HGM100) et contrôle positif (N° de réf. : HGMP2)



AVERTISSEMENT

H317	Peut provoquer une réaction allergique cutanée.
H412	Nocif pour la vie aquatique avec des effets à long terme.
P261	Éviter de respirer les brouillards, les vapeurs ou les aérosols.
P272	Les vêtements de travail contaminés ne doivent pas quitter le lieu de travail.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage/auditive.
P302 + P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU, laver abondamment à l'eau.
P333 + P313	En cas d'irritation de la peau ou d'éruption cutanée, consulter un médecin.
P362 + P364	Retirer les vêtements contaminés et les laver avant de les réutiliser.
P501	Éliminer le contenu/contenant dans un point de collecte des déchets dangereux ou spéciaux, conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.

Contrôle négatif (N° de réf. : HGMNC2)

H412	Nocif pour la vie aquatique avec des effets à long terme.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P501	Éliminer le contenu/contenant dans un point de collecte des déchets dangereux ou spéciaux, conformément à la réglementation locale, régionale, nationale et/ou internationale.

Pour les utilisateurs en dehors de l'Union européenne, l'étiquetage et les dangers suivants s'appliquent :

Solution d'arrêt (N° de réf. : EIASS2)



DANGER

H314	Provoque de graves brûlures de la peau et des lésions oculaires.
H318	Provoque de graves lésions oculaires.
P260	Ne pas respirer le brouillard, les vapeurs ou les aérosols.

P264	Se laver soigneusement les mains, les avant-bras et le visage après manipulation.
P280	Porter des gants de protection, des vêtements de protection, des lunettes de protection contre les produits chimiques et une protection du visage.
P301 + P330 + P331	En cas d'ingestion, rincer la bouche. NE PAS provoquer de vomissements.
P303 + P361 + P353	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux), enlever immédiatement tous les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau ou prendre une douche.
P304 + P340	EN CAS D'INHALATION, amener la personne à l'air frais et assurer son confort respiratoire.
P305 + P351 + P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX, rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P310	Appeler immédiatement un centre antipoison ou un médecin.
P363	Laver les vêtements contaminés avant de les réutiliser.
P405	Garder sous clef.
P501	Éliminer le contenu/récipient conformément aux réglementations locales.

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS À L'INTENTION DES UTILISATEURS

- A. Pour usage diagnostique *in vitro* uniquement.
- B. Évitez les éclaboussures lors de la distribution ou de l'aspiration des réactifs dans les micropuits car cela provoque des erreurs.
- C. Un lavage inadéquat peut entraîner une réactivité de fond excessive dans tout protocole EIA.
- D. Utilisez uniquement les protocoles décrits dans cette notice. Des durées d'incubation ou des températures autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats erronés.
- E. Maintenez des techniques et un schéma de pipetage appropriés tout au long de la procédure pour garantir des résultats optimaux et reproductibles.
- F. Préparez le tampon de lavage en *mesurant* un volume de concentré pour 19 volumes d'eau déminéralisée et en mélangeant bien.

PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Recueillez des échantillons de manière aseptique en utilisant des techniques établies par du personnel qualifié. Lors de la manipulation des échantillons de patients, des mesures adéquates doivent être prises pour éviter l'exposition à des agents étiologiques potentiels. Ce test n'a pas été validé sur des échantillons autres que l'urine.

Les échantillons en transit entre des laboratoires doivent être maintenus entre 2 et 8 °C. Si un retard se produit dans le traitement d'un échantillon, un stockage entre 2 et 8 °C pendant 72 heures ou entre -16 et -24 °C pendant un maximum de 2 semaines est autorisé. Cependant, un échantillon très faiblement positif peut devenir négatif après stockage.

Avant le test, les échantillons doivent être amenés à une température comprise entre 20 et 25 °C.

PROCEDURE DE TEST

Étape 1	Aliquoter suffisamment de réactifs nécessaires pour les tests exécutés ce jour-là, puis replacer les réactifs restants en stockage réfrigéré. (REMARQUE : Lors de l'aliquotage du substrat TMB (5), protéger le réactif de la lumière).
Étape 2	Amener tous les composants du kit à une température comprise entre 20 et 25 °C.
Étape 3	Préparer les étalons de la procédure de courbe étalon (Voir le tableau A) ou les 12,5 ng/ml de calibrateur de la procédure de seuil de calibrateur (Voir le tableau B). (REMARQUE : S'assurer d'utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque flacon et agiter au vortex avant d'effectuer chaque dilution de série.)
Étape 4	Détacher un nombre suffisant de micropuits revêtus d'anticorps de capture (1) pour les échantillons patient, les étalons et les contrôles, et les insérer dans le support de micropuits, en enregistrant la position de chaque échantillon, étalon et contrôle. (REMARQUE : Replacer les micropuits restants dans la poche déshydratante et les stocker entre 2 et 8 °C.)
Étape 5	Ajouter 100 µl de ce qui suit aux différents micropuits : <ul style="list-style-type: none"> • Tampon de lavage 1X (2 dilué à 1X), qui sert de blanc pour le test • Contrôle positif (+) • Contrôle négatif (-) • Étalons ou calibrateur préparés à l'étape 3 • Échantillons de patients
Étape 6	Mélanger en secouant délicatement pendant 1 à 5 secondes sur le plan de travail ou en tapotant délicatement sur le support du micropuits.
Étape 7	Incuber la plaque à 37 °C ±1 °C pendant 60 minutes ±5 minutes.
Étape 8	À l'aide d'une pipette, aspirer le contenu des micropuits et l'éliminer dans un récipient à risque biologique, en changeant les embouts entre les micropuits.
Étape 9	Laver tous les micropuits avec du tampon de lavage 1X (2 dilué à 1X), à l'aide d'un laveur de plaque EIA ou d'une pipette multicanal et retirer le contenu de la plaque après le remplissage, en suivant l'une de ces options : <ol style="list-style-type: none"> 1. Laver les puits avec 370 µl de tampon de lavage 1X pour un total de 3 lavages. 2. Laver les puits avec 300 µl de tampon de lavage 1X pour un total de 5 lavages.
Étape 10	Après le dernier lavage, tapoter la plaque sur une pile propre de serviettes en papier ou autre matériau propre et absorbant suffisamment ferme pour éliminer autant de tampon de lavage 1X restant (2) que possible.
Étape 11	Ajouter 100 µl de conjugué (4) à chaque micropuits et répéter l'étape 6 une fois tous les micropuits remplis de 4.
Étape 12	Incuber la plaque à 37 °C ±1 °C pendant 45 minutes ±5 minutes.
Étape 13	Répéter les étapes 8 à 10.
Étape 14	Ajouter 100 µl de substrat TMB (5) à chaque micropuits. Démarrer un minuteur réglé sur 30 minutes lorsque 5 est ajouté au premier micropuits. Répéter l'étape 6 une fois tous les micropuits remplis de 5.
Étape 15	Incuber à 37 °C ±1 °C pendant le reste des 30 minutes (±1 minute) du minuteur réglé à l'étape 14.
Étape 16	Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (6) à chaque micropuits dans le même ordre qu'à l'étape 14.
Étape 17	Lire et enregistrer les résultats. (REMARQUE : La lecture doit avoir lieu dans les 15 minutes.)

TABLEAU A : RÉACTIFS POUR COURBE ÉTALON

Tube	Étalons (ng/ml)	Volume d'étalon	Volume de 1X 2
A	25	250 µl 3	750 µl
B	12,5	500 µl Tube A	500 µl
C	6,25	500 µl Tube B	500 µl
D	3,1	500 µl Tube C	500 µl
E	1,6	500 µl Tube D	500 µl
F	0,8	500 µl Tube E	500 µl
G	0,4	500 µl Tube F	500 µl

TABLEAU B : RÉACTIFS POUR SEUIL DE CALIBRATEUR

Tube	Calibrateur (ng/ml)	Volume d'étalon	Volume de 1X 2
A	25	250 µl 3	750 µl
B	12,5	500 µl Tube A	500 µl

LECTURE DU TEST

- A. Mélangez en tapotant délicatement le côté de la plaque ou en secouant sur le plan de travail pendant 1 à 5 secondes.
- B. Essayez soigneusement le dessous des micropuits avec un tissu propre et non pelucheux et mesurez l'absorbance de chaque micropuits comme décrit ci-après.
 1. Un lecteur à double longueur d'onde est nécessaire, avec des absorbances lues à 450 nm et 620/630 nm. Contrôlez le blanc sur le tampon de lavage 1X (**2** dilué à 1X). Ce test n'a pas été validé avec un lecteur à longueur d'onde unique.
- C. Éliminez le matériel de test utilisé comme déchet dangereux et conservez le support de micropuits.
- D. Désinfectez le support de micropuits avec un désinfectant tel que :
 1. une solution d'eau de javel à 10 %
 2. de l'éthanol à 70 %
 3. du lysol à 1 % de marque I.C.™

Remarque : Si l'essai est automatisé, veuillez contacter le fabricant de l'équipement pour obtenir des instructions supplémentaires.

CONTRÔLE QUALITÉ ET RÉSULTATS

- A. Le contrôle qualité et les résultats de chaque type de test **ne peuvent pas** être utilisés de manière interchangeable. La courbe étalon doit être effectuée chaque jour de tests patient ; ne pas stocker la courbe pour de futurs tests.

B. PROCÉDURE DE COURBE ÉTALON D'AJUSTEMENT À QUATRE PARAMÈTRES

ÉTALON	VALEUR ACCEPTABLE
25	DO à blanc 1,000 à 2,700
12,5	DO à blanc 0,500 à 1,350
6,25	DO à blanc 0,250 à 0,675
3,1	DO à blanc 0,125 à 0,340
1,6	DO à blanc 0,060 à 0,170
0,8	DO à blanc 0,030 à 0,085
0,4	DO à blanc 0,011 à 0,045
CP	3,5 à 7,5 ng/ml
CN	<0,2 ng/ml
Tampon de lavage 1X (2)	DO brut <0,120
R ²	Courbe à quatre paramètres, ajustée à ≥0,990

RÉSULTATS	CONCENTRATION
Négatif	<0,20 ng/ml
Positif	≥0,20 ng/ml

1. Contrôle qualité :

Un test est considéré comme valide lorsque le seuil du calibrateur (SC), le contrôle positif (CP), le contrôle négatif (CN) et le R² se situent dans les plages acceptables, telles que définies dans les tableaux ci-dessus.

Le contrôle positif, le contrôle négatif et les étalons doivent être inclus dans chaque lot d'échantillons de patients pour garantir la qualité des réactifs. Les contrôles positif et négatif sont destinés à contrôler une défaillance substantielle des réactifs. Le contrôle positif ne doit pas être utilisé comme indicateur de précision des étalons, mais uniquement pour garantir la fonctionnalité des réactifs.

Si la concentration du contrôle positif et/ou du contrôle négatif ne se situe pas dans ces paramètres, les résultats du test du patient doivent être considérés comme non valides et le test doit être répété.

Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou des organismes d'accréditation.

2. Résultats :

Calculez la concentration (ng/ml) comme suit :

- Calculez la valeur moyenne pour chacun des points de la courbe étalon.

ii. Tracez les valeurs de la courbe étalon à l'aide du tableau suivant :

ng/ml (Axe X)	ABSORBANCE (AXE Y)
25	Moyenne des puits (25 ng/ml)
12,5	Moyenne des puits (12,5 ng/ml)
6,25	Moyenne des puits (6,25 ng/ml)
3,1	Moyenne des puits (3,1 ng/ml)
1,6	Moyenne des puits (1,6 ng/ml)
0,8	Moyenne des puits (0,8 ng/ml)
0,4	Moyenne des puits (0,4 ng/ml)

iii. À l'aide du logiciel de spectrophotométrie, calculez une courbe d'ajustement de 4 paramètres :

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

iv. Les concentrations patient sont calculées en substituant les valeurs d'absorbance (DO de blanc).
Voir ci-dessous.

EXEMPLE DE RÉSULTATS ET DE CALCULS* :

PARAMÈTRES DE COURBE D'AJUSTEMENT	VALEURS CALCULÉES
A	-0,019
B	0,964
C	496
D	47,3

Selon l'équation de courbe étalon illustrée ci-dessus, pour un échantillon donnant une absorbance de DO de blanc de 0,695, la concentration serait calculée comme suit :

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

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

*Les chiffres employés ici sont uniquement des exemples aux fins de démonstration ; ne les utilisez pas pour vos propres calculs.

C. PROCÉDURE DE COURBE ÉTALON D'AJUSTEMENT LINÉAIRE

ÉTALON	VALEUR ACCEPTABLE
25	DO à blanc 1,000 à 2,700
12,5	DO à blanc 0,500 à 1,350
6,25	DO à blanc 0,250 à 0,675
3,1	DO à blanc 0,125 à 0,340
1,6	DO à blanc 0,060 à 0,170
0,8	DO à blanc 0,030 à 0,085
0,4	DO à blanc 0,011 à 0,045
CP	3,5 à 7,5 ng/ml
CN	<0,2 ng/ml
Tampon de lavage 1X (2)	DO brut <0,120
R ²	Courbe à LINÉAIRE, ajustée à ≥0,990
Interception Y	-0,025 à 0,030

RÉSULTATS	CONCENTRATION
Négatif	<0,20 ng/ml
Positif	≥0,20 ng/ml

1. Contrôle qualité :

Un test est considéré comme valide lorsque le seuil du calibrateur (SC), le contrôle positif (CP), le contrôle négatif (CN) le R² et l'interception Y se situent dans les plages acceptables, telles que définies dans les tableaux ci-dessus.

Le contrôle positif, le contrôle négatif et les étalons doivent être inclus dans chaque lot d'échantillons de patients pour garantir la qualité des réactifs. Les contrôles positif et négatif sont destinés à contrôler une défaillance substantielle des réactifs. Le contrôle positif ne doit pas être utilisé comme indicateur de précision des étalons, mais uniquement pour garantir la fonctionnalité des réactifs.

Si la concentration du contrôle positif et/ou du contrôle négatif ne se situe pas dans ces paramètres, les résultats du test du patient doivent être considérés comme non valides et le test doit être répété.

Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou des organismes d'accréditation.

2. Résultats :

Calculez la concentration (ng/ml) comme suit :

- i. Calculez la valeur moyenne pour chacun des points de la courbe étalon.

ii. Tracez les valeurs de la courbe étalon à l'aide du tableau suivant :

ng/ml (Axe X)	ABSORBANCE (AXE Y)
25	Moyenne des puits (25 ng/ml)
12,5	Moyenne des puits (12,5 ng/ml)
6,25	Moyenne des puits (6,25 ng/ml)
3,1	Moyenne des puits (3,1 ng/ml)
1,6	Moyenne des puits (1,6 ng/ml)
0,8	Moyenne des puits (0,8 ng/ml)
0,4	Moyenne des puits (0,4 ng/ml)

iii. À l'aide du logiciel de spectrophotométrie ou d'autres moyens appropriés, calculez un ajustement linéaire :

$$Y = mx + b$$

iv. Les concentrations patient sont calculées en substituant les valeurs d'absorbance (DO de blanc).
Voir ci-dessous.

EXEMPLE DE RÉSULTATS ET DE CALCULS* :

PARAMÈTRES D'AJUSTEMENT LINÉAIRE	VALEURS CALCULÉES
m (Pente)	0,0731
b (Interception Y)	0,0232

Selon l'équation de courbe étalon illustrée ci-dessus, pour un échantillon donnant une absorbance de DO de blanc de 0,695, la concentration serait calculée comme suit :

$$0,695 = 0,0731x + 0,0232$$

$$0,695 = 0,0731(\text{concentration}) + 0,0232$$

$$\text{concentration} = \frac{0,695 - 0,0232}{0,0731}$$

$$9,19 \text{ ng/ml} = \frac{0,695 - 0,0232}{0,0731}$$

**Les chiffres employés ici sont uniquement des exemples aux fins de démonstration ; ne les utilisez pas pour vos propres calculs.*

D. PROCÉDURE DE SEUIL DE CALIBRATEUR

CONTRÔLES	VALEUR ACCEPTABLE
Étalon 12,5	DO à blanc 0,500 à 1,350
CP	Unités EIA 2,5 à 7,0
CN	Unités EIA <1,0
Tampon de lavage 1X (2)	DO brut <0,120

RÉSULTATS	UNITÉS EIA
Négatif	Unités EIA <1,0
Positif	Unités EIA ≥1,0

1. CONTRÔLE QUALITÉ :

Un test est considéré comme valide lorsque le seuil 12,5 ng/ml du calibrateur (SC), le contrôle positif (CP), le contrôle négatif (CN) se situent dans les plages acceptables, telles que définies dans le tableau ci-dessus.

Le contrôle positif, le contrôle négatif et le seuil 12,5 ng/ml du calibrateur doivent être inclus dans chaque lot d'échantillons de patients pour garantir la qualité des réactifs. Les contrôles positif et négatif sont destinés à contrôler une défaillance substantielle des réactifs. Le contrôle positif ne doit pas être utilisé comme indicateur de précision du seuil de calibrateur, mais uniquement pour garantir la fonctionnalité des réactifs.

Si les unités EIA du contrôle positif et/ou du contrôle négatif ne se situent pas dans ces paramètres, les résultats du test du patient doivent être considérés comme non valides et le test doit être répété.

Des contrôles supplémentaires peuvent être testés conformément aux directives ou aux exigences des réglementations locales, nationales et/ou fédérales ou des organismes d'accréditation.

2. Résultats :

Calculez la concentration (unités EIA) comme suit :

- Calculez la valeur moyenne pour l'étalon de 12,5 ng/ml.
- À l'aide de l'équation suivante, calculez les unités EIA de l'échantillon :

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

EXEMPLE :

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

- À partir du tableau ci-dessus, comparez les unités EIA de l'échantillon afin de déterminer un résultat positif ou négatif.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

A. PROCÉDURE DE COURBE ÉTALON

1. Interférence :

Le test HGM201 a été évalué pour le potentiel d'interférence sur les conditions urinaires suivantes : urine sanglante, protéinurie, mucus, cylindres hyalins, cellules épithéliales dans l'urine, cétonurie et bilirubine. Ces échantillons ne présentent aucune interférence dans le test.

2. Réactivité croisée :

Le test HGM201 a été évalué pour la réactivité croisée avec un panel d'échantillons de patients dans une variété de pathologies différentes. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Pathologie	Nombre d'échantillons	% de positifs
<i>Paracoccidioides</i> *	1	100 % (1/1)
<i>Blastomyces</i>	11	64 % (7/11)
<i>Candida</i>	10	10 % (1/10)
<i>Coccidioides Ab</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)

*Indique l'utilisation de l'antigène ID car aucun échantillon de patient n'est disponible pour les caractéristiques de performance.

3. Comparaison des méthodes :

Le test HGM201 a été comparé au test ALPHA *Histoplasma* EIA d'IMMY (HAG102) en interne. Au total, 277 échantillons d'urine ont été testés sur les deux tests, selon leur notice d'accompagnement. L'analyse de ces données a été effectuée pour déterminer le pourcentage de concordance positive et le pourcentage de concordance négative. Les résultats de cette comparaison sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

		IMMY HAG102	
		Pos.	Nég.
IMMY clarus HGM201 EIA	Pos.	48	35
	Nég.	10	184

	Calculé	IC à 95 % calculé
% de concordance positive	82,76 %	70,57 % à 91,41 %
% de concordance négative	84,02 %	78,48 % à 88,61 %

La comparaison au test HAG102 a montré 35 « faux-positifs » pour le test HGM201. Après une analyse plus approfondie de ces échantillons, il a été conclu que 27 d'entre eux étaient des cas avérés d'histoplasmose. Sur les 8 « faux positifs » qui n'étaient pas des cas avérés d'histoplasmose, 6 étaient des cas de *Blastomyces* sp. confirmés par culture, ce qui a montré une réaction croisée lors du test. Les tableaux qui suivent reprennent ces informations :

		IMMY HAG102	
		Pos.	Nég.
IMMY clarus HGM201 EIA	Pos.	48	2
	Nég.	10	184

	Calculé	IC à 95 %
% de concordance positive	82,76 %	70,57 % à 91,41 %
% de concordance négative	98,92 %	96,17 % à 99,87 %

4. Précision :

La précision (Reproductibilité) du HGM201 a été évaluée par IMMY en utilisant des étalons et un panel de cinq échantillons du HGM201 conformément à la norme EP-17A du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Le panel d'échantillons a été testé une fois par jour pendant 5 jours au total. Échantillons testés : étalons (fabriqués conformément à la notice), trois urines positives (hautement positive, moyennement positive et faiblement positive) et deux urines négatives.

Pour plus de précision, la moyenne, l'écart-type et le % de CV ont été calculés pour les valeurs de DO à blanc et de concentration. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Concentration			
	Moyenne (ng/ml)	ET	% de CV
Urine hautement positive	26,398	1,179	4,466
Urine moyennement positive	7,156	0,308	4,298
Urine faiblement positive	1,262	0,154	12,165
Urine négative 1	0,000	0,000	0,000
Urine négative 2	0,000	0,000	0,000
Contrôle positif	5,557	0,387	6,961
Contrôle négatif	0,000	0,000	0,000

B. PROCÉDURE DE SEUIL DE CALIBRATEUR

1. Interférence :

Le test HGM201 a été évalué pour le potentiel d'interférence sur les conditions urinaires suivantes : urine sanglante, protéinurie, mucus, cylindres hyalins, cellules épithéliales dans l'urine, cétonurie et bilirubine. Ces échantillons ne présentent aucune interférence dans le test.

2. Réactivité croisée :

Le test HGM201 a été évalué pour la réactivité croisée avec un panel d'échantillons de patients dans une variété de pathologies différentes. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Pathologie	Nombre d'échantillons	% de positifs
<i>Paracoccidioides</i> *	1	100 % (1/1)
<i>Blastomyces</i>	11	55 % (6/11)
<i>Candida</i>	10	0 % (0/10)
<i>Coccidioides Ab</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)

*Indique l'utilisation de l'antigène ID car aucun échantillon de patient n'est disponible pour les caractéristiques de performance.

3. Comparaison de méthodes

Le test HGM201 a été comparé au test HAG102 en interne. 277 échantillons d'urine au total ont été testés sur les deux tests, selon leur notice d'accompagnement. L'analyse de ces données a été effectuée pour déterminer le pourcentage de concordance positive et le pourcentage de concordance négative. Les résultats de cette comparaison sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

		IMMY HAG102	
		Pos.	Nég.
IMMY clarus HGM201 EIA	Pos.	47	31
	Nég.	11	188

	Calculé	IC à 95 %
% de concordance positive	81,03 %	68,59 % à 90,13 %
% de concordance négative	85,84 %	80,51 % à 90,18 %

La comparaison au test HAG102 a montré 31 « faux-positifs » pour le test HGM201. Après une analyse plus approfondie de ces échantillons, il a été conclu que 25 d'entre eux étaient des cas avérés d'histoplasmose. Sur les 6 « faux positifs » qui n'étaient pas des cas avérés d'histoplasmose, 5 étaient des cas de *Blastomyces* confirmés par culture, qui a montré une réaction croisée lors du test. Les tableaux ci-dessous reprennent ces informations :

		IMMY HAG102	
		Pos.	Nég.
IMMY clarus HGM201 EIA	Pos.	47	1
	Nég.	11	188

	Calculé	IC à 95 %
% de concordance positive	81,03 %	68,59 % à 90,13 %
% de concordance négative	99,47 %	97,09 % à 99,99 %

4. Précision :

La précision (Reproductibilité) du HGM201 a été évaluée par IMMY en utilisant des étalons et un panel de cinq échantillons du HGM201 conformément à la norme EP-17A du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Le panel d'échantillons a été testé une fois par jour pendant 5 jours au total. Échantillons testés : étalon (fabriqué conformément à la notice), trois urines positives (hautelement positive, moyennement positive et faiblement positive) et deux urines négatives.

Pour plus de précision, la moyenne, l'écart-type et le % de CV ont été calculés pour les valeurs de DO à blanc et d'unités EIA. Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Concentration			
	Moyenne (Unités EIA)	ET	% de CV
Urine hautement positive	24,436	0,712	2,9 %
Urine moyennement positive	5,164	0,292	5,6 %
Urine faiblement positive	0,731	0,097	13,2 %
Urine négative 1	-0,235	0,036	-15,3 %
Urine négative 2	-0,227	0,053	-23,3 %
Contrôle positif	3,813	0,322	8,5 %
Contrôle négatif	-0,098	0,047	-48,3 %

LIMITES

- Le test HGM201 est destiné à être utilisé avec des échantillons d'urine. Ce test n'a pas été validé sur des échantillons autres que l'urine.
- Laisser chauffer à température ambiante uniquement le volume de réactifs nécessaire pour le nombre de micropuits à utiliser. La performance des réactifs n'a pas été déterminée lorsqu'ils sont exposés à des fluctuations de température.
- Un résultat négatif n'exclut pas un diagnostic d'histoplasmose.
- Il a été constaté une réaction croisée du HGM201 avec des échantillons de *Paracoccidioides*, *Blastomyces*, et de quelques *Candida*. Les tests positifs doivent être confirmés dans les zones ou les groupes de patients où ces organismes sont endémiques ou à risque.
- Le test HGM201 n'est pas destiné à la surveillance d'un traitement.
- Un lavage inadéquat pendant la procédure de test peut entraîner une réactivité de fond excessive.
- Utiliser uniquement les protocoles décrits dans cette notice. Des durées d'incubation ou des températures autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats inexacts.
- La performance du HGM201 n'a pas été établie pour la lecture manuelle et/ou la détermination visuelle des résultats.
- Les tests ne doivent pas être effectués comme une procédure de dépistage pour la population générale. La valeur prédictive d'un résultat positif ou négatif dépend de la probabilité pré-test de présence d'histoplasmose. Les tests doivent être effectués uniquement lorsque des preuves cliniques suggèrent le diagnostic d'histoplasmose.
- Il est possible que des micropuits négatifs d'échantillons de patient soient contaminés par des micropuits de contrôle positif ou d'échantillon de patient si le contenu d'un micropuits déborde dans un autre micropuits. Cela peut être dû à une manipulation brutale de la microplaque ou à une mauvaise technique de pipetage lors de l'ajout de réactifs.
- Bien qu'il n'ait pas été testé dans HGM201, *Talaromyces marneffei* est connu pour sa réaction croisée avec les anticorps *Histoplasma*.
- La performance de HGM201 est inconnue lorsque des échantillons comprenant les substances suivantes sont testés : aliments qui produisent une couleur dans l'urine, crème vaginale, caféine, acide ascorbique, itraconazole, amphotéricine B., acétaminophène ou acide acétylsalicylique.

- Les résultats entre différents tests d'*Histoplasma capsulatum* ne peuvent pas être comparés.







INFORMATIONS SUR LES DANGERS ET LES MISES EN GARDE

Reportez-vous aux fiches de données de sécurité (FDS) du produit pour connaître les dangers et les mises en garde.

DÉPANNAGE

PROBLÈME	SOLUTION
Résultats variables selon les répétitions	<ul style="list-style-type: none"> • Configurer les étalons, les contrôles et les échantillons dans une plaque à 96 puits séparée, propre et non revêtue. • Utiliser la pipette multicanal pour pipeter de la plaque à 96 puits dans les micropuits (1).
Suspicion de contamination des micropuits	<ul style="list-style-type: none"> • Tapoter délicatement la plaque pour mélanger les réactifs dans les micropuits afin d'éviter les éclaboussures. • Prendre des précautions lors du pipetage pour s'assurer qu'il n'y a pas d'éclaboussures ou de transfert entre micropuits voisins. • Changer d'embout entre les micropuits.
Échec de la courbe étalon	<ul style="list-style-type: none"> • Précautions à prendre lors de la préparation des étalons : agiter au vortex entre les dilutions, utiliser des techniques de pipetage précises et soigneuses et changer les embouts entre les dilutions
DO inférieures aux prévisions (Réactifs trop froids)	<ul style="list-style-type: none"> • S'assurer que tous les réactifs atteignent une température située entre 20 et 25 °C avant le test. • Stocker les réactifs dans un environnement à température contrôlée. (p. ex. incubateur) lors de leur transition vers 20 à 25 °C. Le cas échéant, placer les réactifs dans un incubateur réglé sur 20 à 25 °C pendant 30 minutes ou sur 37°C pendant 10 minutes.
Effets de bords ?	<ul style="list-style-type: none"> • Il a été démontré que les effets de bords ne sont pas significatifs.
Utilisation d'échantillons autres que d'urine ?	<ul style="list-style-type: none"> • Ce test est destiné uniquement à des échantillons d'urine.

SYMBÔLES

	Contenu suffisant pour XX déterminations	REF	Numéro de catalogue/ Numéro de référence
	Consulter le mode d'emploi	LOT	Numéro de lot
	Fabricant	IVD	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i> uniquement
	Date limite d'utilisation/ d'expiration	EC REP	Mandataire pour la Communauté européenne
	Limites de température	CONTROL	Contrôle
CE	Marquage CE de conformité		Usage unique
Rx ONLY	Utilisation sur ordonnance uniquement		

BIBLIOGRAPHIE

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, Samayoa 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.

Rev. 2
PIS-00248



IMMY, Inc.

2701 Corporate Centre Dr
Norman, OK 73069 USA
+1 (405) 360-4669 / (800) 654-3639
Fax: +1 (405) 364-1058
Email: info@immy.com
www.immy.com



MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany