



Rx ONLY



2°C



ESPAÑOL

CLARUS *HISTOPLASMA GALACTOMANNAN EIA*

REF N.º: HGM201

USO PREVISTO

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

La prueba clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA puede ser realizada manualmente o utilizando sistemas automatizados para ensayos inmunoenzimáticos. Esta prueba está destinada a ser realizada por profesionales de laboratorio capacitados.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Histoplasma capsulatum (*H. capsulatum*) es hongo dimórfico patógeno con distribución mundial. Es endémico a las cuencas de los ríos Ohio y Misisipi, 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 micoses 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, 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 immunodifusión y fijación del complemento son métodos serológicos usados como alternativas rápidas a las técnicas microbiológicas.³

El aislamiento de *H. capsulatum* por cultivo de muestras clínicas sigue siendo el diagnóstico definitivo de histoplasmosis.^{4,5} 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 Además, la sensibilidad del cultivo es altamente variable, y el manejo de los aisladores debe hacerse en laboratorios de nivel BSL3. 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 el antígeno Galactomanano) 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 antígeno Galactomanano de *Histoplasma* en muestras de orina. El galactomanano es un polisacárido que se encuentra en la pared celular fúngica. Los anticuerpos monoclonales 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 (anticuerpo de detección) son usados para confirmar la captura del antígeno. Las muestras de orina, sin algún pretratamiento, se añaden a los micropocillos que están cubiertos con los anticuerpos Anti-*Histoplasma*.

Si la muestra del paciente contiene Galactomanano de *Histoplasma*, este 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 de detección con peroxidasa de rábano (PHR), se añaden 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 el antígeno está presente en la muestra del paciente, se forma una solución de color azul al añadir el 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). La reacción es interrumpida con la adición de la solución de interrupción, donde los pozos de color azul se tornan a un color amarillo. 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

HGM201 dispone de dos métodos para obtener resultados utilizando muestras de orina; el procedimiento de curva estándar (curva estándar de cuatro parámetros o ajuste lineal) 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. Este procedimiento requiere de la muestra del paciente, 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	N.º de referencia	Cantidad	DESCRIPCIÓN	Símbolo en la etiqueta	Símbolos de advertencias
Microwell Plate	HGMMW2	96 c/	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	
Positive Control	HGMPC2	1 mL	<i>Histoplasma</i> Galactomanano en una solución de proteína tamponada conteniendo un preservante.		
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 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB).	5	N/A
Stop Solution	EIASS2	10 mL	Solución de ácido metanosulfónico.	6	

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

- Todo el kit HGM201 debe de ser almacenado a entre 2 °C y 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 °C-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 °C a 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 hoja de datos de seguridad HGM201 (SDS) para obtener más información sobre los peligros y las advertencias.

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 o ajuste lineal.
- 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.
- I. Contenedor de residuos con riesgo biológico.

PRECAUCIONES PARA LOS REACTIVOS

- A. La estandarización específica es necesaria para producir nuestros reactivos y materiales de alta calidad.
- B. El usuario asume completa responsabilidad por cualquier modificación al procedimiento publicado aquí.
- C. No utilice el kit o cualquier reactivo del kit después de la fecha de caducidad indicada.
- D. En el momento de cada uso, los componentes del kit deben ser inspeccionados visualmente para evidenciar señales de contaminación microbiana, fuga, o daños físicos significativos a los micropocillos. Desechar si se encuentran estas condiciones.
- E. 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 numero de lote diferente u otros fabricantes.
- F. 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.
- G. Los siguientes reactivos están etiquetados y tienen peligros asociados:

Para los usuarios dentro de la Unión Europea, se aplican las siguientes etiquetas y riesgos:

Stop Solution (REF n.º: EIASS2)



PELIGRO

H314	Causa quemaduras graves de la piel y daños oculares.
P260	No respire niebla/vapor/espray.
P264	Lávese bien las manos, los antebrazos y la cara después de manejar.
P280	Use guantes de protección / ropa protectora / protección de los ojos / protección facial / protección auditiva.
P303 + P361 + P353	SI ENTRA EN CONTACTO CON LA PIEL (o cabello), quitar inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuague la piel con agua.
P305 + P351 + P338	SI ENTRA EN CONTACTO CON LOS OJOS, enjuague cuidadosamente con agua durante varios minutos. Remueva lentes de contacto, si están presentes y es fáciles de hacer. Siga lavando.
P310	Inmediatamente llame a un centro de control de envenenamiento o a un médico.
P501	Elimine el contenido/contenedor de acuerdo con las regulaciones locales.

Standard (REF n.º: HGM100) y Positive Control (REF n.º: HGMPG2)



ADVERTENCIA

H317	Puede causar una reacción alérgica de la piel.
H412	Nocivo para la vida acuática con efectos duraderos.
P261	Evite respirar niebla/vapor/espray.
P272	No se debe permitir que la ropa de trabajo contaminada salga del lugar de trabajo.
P280	Use guantes de protección / ropa protectora / protección de los ojos / protección facial / protección auditiva.
P302 + P352	SI ENTRA EN CONTACTO CON LA PIEL, lave con mucha agua.
P333 + P313	Si se produce irritación de la piel o erupción cutánea, solicite asesoramiento médico.
P362 + P364	Remueva la ropa contaminada y lave antes de reutilizarla.
P501	Elimine el contenido/contenedor en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de conformidad con las normas locales, regionales, nacionales y/o internacionales.

Negative Control (REF n.º: HGMNC2)

H412	Nocivo para la vida acuática con efectos duraderos.
P273	Evitar la liberación al medio ambiente.
P501	Eliminar el contenido/contenedor en un punto de recogida de residuos peligrosos o especiales, de conformidad con las normas locales, regionales, nacionales y/o internacionales.

Para usuarios fuera de la Unión Europea, se aplican las siguientes etiquetas y riesgos

Stop Solution (REF n.º: EIASS2)



H314	Causa quemaduras graves de la piel y daños oculares.
H318	Causa graves daños oculares.
P260	No respirar niebla/vapor/espray
P264	Lávese bien las manos, los antebrazos y la cara después del manejo.
P280	Use guantes protectores, ropa protectora, gafas químicas y protección facial.
P301 + P330 + P331	Si se ingiere, enjuague la boca. NO induzca vómitos.
P303 + P361 + P353	SI ENTRA EN CONTACTO CON LA PIEL (o cabello), quite inmediatamente toda la ropa contaminada. Enjuague la piel con agua.
P304 + P340	SI SE INHALA, retire a la persona al aire fresco y mantenga la respiración cómoda.
P305 + P351 + P338	SI ENTRA EN CONTACTO CON LOS OJOS, enjuague cuidadosamente con agua durante varios minutos. Remueva lentes de contacto, si están presentes y es fáciles de hacer. Siga lavando.

P310	Inmediatamente llame a un CENTRO de CONTROL de ENVENENAMIENTO o a un médico.
P363	Lávese la ropa contaminada antes de reutilizarla.
P405	Almacenar en un lugar seguro.
P501	Eliminar el contenido/contenedor de acuerdo con las regulaciones locales.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA USUARIOS

- A. Solo para uso diagnóstico *in vitro*.
- B. Evitar salpicaduras al dispensar los reactivos en los tubos o en los pocillos de la placa, ya que esto puede causar resultados erróneos.
- C. El lavado insuficiente y la incubación inadecuada pueden causar una reactividad excesiva en cualquier protocolo de ELISA.
- D. Seguir solo los protocolos descritos en este prospecto. Los tiempos y las temperaturas de incubación que no estén especificados pueden dar resultados erróneos.
- E. Mantenga un patrón de técnicas de pipeteo adecuadas durante todo el procedimiento para garantizar resultados óptimos y reproducibles.
- F. Prepare la solución de lavado *midiendo* una parte concentrada más 19 partes de agua desionizada y mezclando bien.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Utilizando las técnicas establecidas por personal calificado, recolecte 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.

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

Las muestras deben de estar a temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) antes de utilizarse.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Paso 1	Prepare suficientes alícuotas de los reactivos para las pruebas que se harán ese día. Regrese los reactivos sin utilizar a entre 2 °C y 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 °C-25 °C).
Paso 3	Prepare los estándares para el procedimiento de la curva estándarEstándar (Tabla A) o el calibrador de 12,5 ng/ml 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	Remueve el número necesario de Micropocillos de Captura Recubiertos con Anticuerpos (1) e insértelos en un portaplatas. Prepare los estándares y los controles,. Prepare una tabla para la identificación de las muestras de los pacientes, los estándares o calibrador, y los controles en las micropocillas. <i>(NOTA: Vuelva a colocar las tiras no utilizadas y selle la bolsa con el desecante. Almacenar a entre 2 °C y 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. • Muestras de los pacientes.

Paso 6	Homogeneice agitando suavemente la placa en la mesa de laboratorio de 1 a 5 segundos.
Paso 7	Incube la placa durante 60 minutos ± 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
Paso 8	Aspire el contenido de todos los micropocillos con una pipeta, utilizando una punta nueva en cada micropocillo, y deseche en un recipiente de riesgo biológico.
Paso 9	Invierta la microplaca para eliminar los restos de líquido. Lave todos los micropocillos con solución de lavado 1X (2 diluida a 1X), utilizando un lavador de microplacas, o una pipeta multicanal, utilizando una de las dos siguientes opciones: 1. Lavar todos los micropocillos con $370\ \mu\text{L}$ de solución de lavado 1x y repita el lavado tres veces. 2. Lavar todos los micropocillos con $300\ \mu\text{L}$ de solución de lavado 1x y repita el lavado cinco veces.
Paso 10	Después del lavado final, seque la placa usando un papel absorbente para eliminar en los micropocillos cualquier exceso de solución de lavado 1x (2 diluida a 1X).
Paso 11	Añada $100\ \mu\text{L}$ del Conjuguado (4) a cada micropocillo y repita el Paso 6.
Paso 12	Incube la placa durante 45 minutos ± 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
Paso 13	Repita los Pasos 8 a 10.
Paso 14	Añada $100\ \mu\text{L}$ 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 30 minutos (± 1 minutos) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
Paso 16	Añada $100\ \mu\text{L}$ solución de interrupción (6) a cada micropocillo en el mismo orden de la adición del Paso 14.
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	$250\ \mu\text{L}$ 3	$750\ \mu\text{L}$
B	12,5	$500\ \mu\text{L}$ Tubo A	$500\ \mu\text{L}$
C	6,25	$500\ \mu\text{L}$ Tubo B	$500\ \mu\text{L}$
D	3,1	$500\ \mu\text{L}$ Tubo C	$500\ \mu\text{L}$
E	1,6	$500\ \mu\text{L}$ Tubo D	$500\ \mu\text{L}$
F	0,8	$500\ \mu\text{L}$ Tubo E	$500\ \mu\text{L}$
G	0,4	$500\ \mu\text{L}$ Tubo F	$500\ \mu\text{L}$

TABLA B: REACTIVOS DEL PUNTO DE CORTE DEL CALIBRADOR

Tubo	Calibrador (ng/mL)	Volumen de Estándar	Volumen de 1X 2
A	25	$250\ \mu\text{L}$ 3	$750\ \mu\text{L}$
B	12,5	$500\ \mu\text{L}$ Tubo A	$500\ \mu\text{L}$

LECTURA DE LA PRUEBA

- A. Homogeneice agitando suavemente la placa en la mesa de laboratorio de 1 a 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 una sola longitud de 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 portaplacas incluyen:
 1. Una solución de lejía al 10 %
 2. Etanol al 70 %
 3. Una desinfectante marca Lysol I.C.™ 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 Y RESULTADOS

- A. Los resultados y los valores del Control de Calidad para cada prueba no pueden usarse de manera indistinta. La curva estándar o el calibrador debe hacerse todos los días de la prueba del paciente, no guarde la curva para hacerla en el futuro.

B. PROCEDIMIENTO DE CURVA ESTÁNDAR – AJUSTE DE CURVA DE CUATRO PARÁMETROS

ESTÁNDAR	VALOR ACEPTABLE
25	DO ajustada 1,000 – 2,700
12,5	DO ajustada 0,500 – 1,350
6,25	DO ajustada 0,250 – 0,675
3,1	DO ajustada 0,125 – 0,340
1,6	DO ajustada 0,060 – 0,170
0,8	DO ajustada 0,030 – 0,085
0,4	DO ajustada 0,011 - 0,045
Control positivo	3,5 - 7,5 ng/mL
Control negativo	< 0,2 ng/mL
Solución de lavado 1x (2)	DO en bruto <0,120
R ²	Ajuste de la curva de cuatro parámetros ≥0,990

RESULTADOS	CONCENTRACIÓN
Negativo	<0,20 ng/mL
Positivo	≥ 0,20 ng/mL

1. Control de calidad:

El ensayo es considerado válido cuando los estándares, el control positivo (PC), el control negativo (NC) y la R² se encuentran dentro de los parámetros aceptables como se definen en las tablas anteriores.

El control positivo, el control negativo y los estándares deben incluirse en cada lote de las muestras de los pacientes para ofrecer una garantía de calidad de los reactivos. Los controles positivos y negativos se usan para estar atento a una falla sustancial de los reactivos. El control positivo no debe usarse como un indicador de precisión de los estándares, solo asegura la funcionalidad de los reactivos.

Si la concentración de los controles positivo 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 o federales, o de organizaciones acreditadas.

2. Resultados:

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

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

ng/mL (eje-X)	ABSORBANCIA (EJE-Y)
25	Promedio de los micropocillos (25 ng/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 (1,6 ng/mL)
0,8	Promedio de los micropocillos (0,8 ng/mL)
0,4	Promedio de los micropocillos (0,4 ng/mL)

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

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

- Las concentraciones del paciente se calculan mediante la sustitución de los valores de absorbancia (DO corregida respecto a un blanco). Vea abajo.

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 calculará de la siguiente manera:

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

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

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

C. PROCEDIMIENTO DE CURVA ESTÁNDAR – AJUSTE LINEAL

ESTÁNDAR	CRITERIOS DE VALIDEZ
25	DO ajustada 1,000 – 2,700
12,5	DO ajustada 0,500 – 1,350
6,25	DO ajustada 0,250 – 0,675
3,1	DO ajustada 0,125 – 0,340
1,6	DO ajustada 0,060 – 0,170
0,8	DO ajustada 0,030 – 0,085
0,4	DO ajustada 0,011 - 0,045
Control positivo	3,5 - 7,5 ng/mL
Control negativo	< 0,2 ng/mL
Solución de lavado 1X (2)	DO en bruto <0,120
R ²	≥ 0,990 usando un ajuste de curva de lineal
Intersección en Y	-0,025 – 0,030

RESULTADOS	CONCENTRACIÓN
Negativo	<0,20 ng/mL
Positivo	≥ 0,20 ng/mL

1. Control de calidad:

El ensayo se considera válido cuando los estándares, el control positivo (PC), el control negativo (NC), la intersección en Y y la R² se encuentran dentro de los parámetros aceptables como se definen en las tablas anteriores.

El control positivo, el control negativo y los estándares deben incluirse en cada lote de las muestras de los pacientes para ofrecer una garantía de calidad de los reactivos. Los controles positivos y negativos se usan para estar atento a una falla sustancial de los reactivos. El control positivo no debe usarse como un indicador de precisión de los estándares, solo asegura la funcionalidad de los reactivos.

Si la concentración de los controles positivo 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 o federales, o de organizaciones acreditadas.

2. Resultados:

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

- 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 (25 ng/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 (1,6 ng/mL)
0,8	Promedio de los micropocillos (0,8 ng/mL)
0,4	Promedio de los micropocillos (0,4 ng/mL)

iii. Usando el software de espectrofotómetro, u otros medios apropiados, calcular un ajuste lineal:

$$Y = mx + b$$

iv. Las concentraciones del paciente son calculadas mediante la sustitución de los valores de absorbancia (DO corregida con respecto a un blanco). Vea a continuación.

EJEMPLO DE LOS RESULTADOS Y VALORES CALCULADOS*:

PARÁMETROS DE AJUSTE LINEAL		VALORES CALCULADOS
m (Inclinación)		0.0731
b (Intersección de Y)		0.0232

Usando la ecuación de curva estándar que se muestra anteriormente, para una muestra que da una absorbencia OD corregida con respecto a un blanco de 0.695, la concentración se calcularía de la siguiente manera:

$$0.695 = 0.0731x + 0.0232$$

$$0.695 = 0.0731(\text{concentración}) + 0.0232$$

$$\text{concentración} = \frac{0.695 - 0.0232}{0.0731}$$

$$9.19 \text{ ng/mL} = \frac{0.695 - .0232}{0.0731}$$

* Los números que figuran aquí solo sirven como ejemplos para fines de demostración, no utilice estos números para sus propios cálculos.

D. PROCEDIMIENTO DEL PUNTO DE CORTE DEL CALIBRADOR

CONTROLES	CRITERIOS DE VALIDEZ
12,5 estándar	DO ajustada 0,500 – 1,350
Control Positivo	2,5 - 7,0 Unidades de EIA

CONTROLES	CRITERIOS DE VALIDEZ
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:

Un ensayo se considera válido cuando el punto de corte del calibrador (CC) de 12,5 ng/ml, el control positivo (PC) y el control negativo (NC) se encuentran dentro de los parámetros aceptables como se definen en las tablas anteriores.

El control positivo, el control negativo y el punto de corte del calibrador (CC) de 12,5 ng/ml deben incluirse en cada lote de muestras del paciente para proporcionar una garantía de la calidad de los reactivos. Los controles positivo y negativo sirven para estar atento a 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 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 los requisitos de las regulaciones locales, estatales o federales, o de organizaciones acreditadas.

2. Resultados:

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

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

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

Ejemplo:

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

- Utilizando la tabla anterior, compare las unidades de EIA de la muestra para determinar si es un resultado positivo o negativo.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

A. PROCEDIMIENTO DE LA CURVA ESTÁNDAR

1. Interferencia

Se analizó HGM201 en relación con la posibilidad de interferencia debido a las condiciones de la orina: orina con sangre, proteinuria, mucosa, cilindros, células epiteliales en la orina, cetonuria, y bilirrubina. Estas muestras no mostraron interferencia en el ensayo.

2. Reactividad cruzada

Se analizó HGM201 para determinar la reactividad cruzada con un panel de muestras de pacientes con diferentes patologías. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente tabla.

Patología	Número de muestras	% positivo
<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)

* Indica el uso de un antígeno ID, ya que no hay muestras de pacientes disponibles para las Características de rendimiento.

3. Comparación de métodos:

Se comparó HGM201 con ALPHA *Histoplasma* EIA de IMMY (HAG102) de manera interna. Se hicieron pruebas sobre un total de 277 muestras de orina en ambos ensayos según los prospectos del paquete. El análisis de estos datos se hizo para determinar la concordancia porcentual entre negativo y positivo. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

		IMMY HAG102			Calculado	95% CI
		Pos.	Neg.			
IMMY clarus	Pos.	48	35	% Concordancia Positiva	82.76%	70.57%-91.41%
	Neg.	10	184	% Concordancia Negativa	84.02%	78.48%-88.61%

La comparación con HAG102 dio lugar a 35 “falsos positivos” en HGM201. Después de un análisis adicional en estas muestras, se concluyó que 26 de ellas 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:

4. Precisión

Se evaluó la precisión (reproducibilidad) en HGM201 en IMMY analizando los estándares y un panel de cinco muestras en HGM201 siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) EP-17A. Este panel de muestras fue analizado a diario durante 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 la precisión, se calcularon la media, la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) para la OD corregida con respecto a un blanco y los valores de concentración. Los resultados se muestran en la tabla abajo:

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

Se evaluó HGM201 en relación con la posibilidad de interferencia debido a las condiciones de la orina: orina con sangre, proteinuria, mucosa, cilindros, células epiteliales en la orina, cetonuria y bilirrubina. Estas muestras no mostraron interferencia en el ensayo.

2. Reactividad Cruzada

Se evaluó HGM201 para determinar la reactividad cruzada con un panel de muestras de pacientes con diferentes patologías. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente tabla.

Patología	Número de muestras	% positivo
<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)

Patología	Número de muestras	% positivo
<i>Pneumocystis</i>	3	0% (0/3)
<i>Malassezia</i>	1	0% (0/1)

* Indica el uso de un antígeno ID, ya que no hay muestras de pacientes disponibles para las Características de rendimiento.

3. Comparación de métodos

Se comparó HGM201 con HAG102 de manera interna. Se hicieron pruebas sobre un total de 277 muestras de orina en ambos ensayos según los prospectos del paquete. El análisis de estos datos se hizo para determinar la concordancia porcentual entre negativo y positivo. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

		IMMY HAG102		Calculado	95% CI	
		Pos.	Neg.			
IMMY clarus HGM201 EIA	Pos.	47	31	% Concordancia Positiva	81.03% 68.59%-90.13%	
	Neg.	11	188			

La comparación con HAG102 dio lugar a 31 “falsos positivos” en HGM201. Después de un análisis adicional en estas muestras, se concluyó que 25 de ellas 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*, 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.	47	1	% Concordancia Positiva	81.03% 68.59%-90.13%	
	Neg.	11	188			

4. Precisión

Se evaluó la precisión (reproducibilidad) en HGM201 en IMMY analizando los estándares y un panel de cinco muestras en HGM201 siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) EP-17A. Este panel de muestras fue analizado a diario durante 5 días. Las muestras analizadas fueron las siguientes: estándar (preparado 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 la precisión, se calcularon la media, la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) para la OD corregida con respecto a un blanco y los valores de unidades de EIA. Los resultados se muestran en la tabla abajo:

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%

Concentración			
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 muestras de orina. Las características de rendimiento de esta prueba no han sido evaluadas para otro tipo de muestras.
- Solo permite que el volumen 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 detectó reactividad cruzada con la prueba HGM201 y *Paracoccidioides*, *Cándida* y *Blastomycosis*. Los resultados positivos deben de confirmarse en áreas o grupos de pacientes en los que estos organismos son endémicos o un riesgo.
- La prueba de HGM201 no debe de ser utilizada como tratamiento de vigilancia.
- Un lavado inadecuado durante el procedimiento de prueba puede provocar una reactividad de fondo excesiva.
- Siga 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 marneffei* presenta reactividad cruzada con anticuerpos anti-*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, paracetamol o ácido acetilsalicílico.
- No se pueden comparar resultados entre diferentes ensayos de detección de antígeno de *Histoplasma capsulatum*.

INFORMACIÓN SOBRE ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Consulte la Hoja de datos de seguridad (SDS) para obtener más información sobre las advertencias y precauciones.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

PROBLEMA	SOLUCIÓN
Resultados variables a través de réplicas	<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)

PROBLEMA	SOLUCIÓN
Sospecha de contaminación en los micropocillos	<ul style="list-style-type: none"> Homogeneice 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.
DO más baja de lo esperado (reactivos demasiado fríos)	<ul style="list-style-type: none"> Asegúrese de que todos los reactivos lleguen a 20 °C -25 °C antes del ensayo Almacenar los reactivos en un ambiente controlado por la temperatura (por ejemplo, en la incubadora) al elevarlos a 20-25°C. Esto se puede hacer colocando los reactivos en una incubadora de 20-25°C durante 30 minutos o en una de 37 °C por 10 minutos.
¿Efecto limítrofe?	<ul style="list-style-type: none"> El efecto limítrofe no es significativo.
¿Se usan muestras diferentes a la orina?	<ul style="list-style-type: none"> Este ensayo solo es para muestras de orina.

SÍMBOLOS

	Suficiente para XX determinaciones		Número de catálogo/Número de referencia
	Consulte las instrucciones de uso		Número de lote
	Fabricante		Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Fecha de caducidad		Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Limitación de temperatura		Control
	Marca de conformidad CE		Único uso
	Uso exclusivo con receta		

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, 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

