



PORTUGUÊS

CLARUS *HISTOPLASMA* GALACTOMANNAN EIA

N.º REF.: HGM201

UTILIZAÇÃO

O clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA (N.º REF.: 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 diagnóstico, tais como cultura microbiológica, exame histológico de amostras de biópsia e evidências radiográficas, este teste pode ser utilizado no auxílio do diagnóstico de histoplasmose.

O clarus *Histoplasma* Galactomannan EIA pode ser utilizado manualmente ou utilizando um sistema automatizado para placas de teste ELISA. O ensaio é indicado para ser executado por profissionais de laboratório treinados.

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 aspiração 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 em 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 Além disso, a sensibilidade dos ensaios de cultura são muito variáveis, e o manuseio de fungos isolados só deve ser feito em laboratórios com nível de segurança 3 (BSL3). 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 do fungo. Anticorpos IgG anti-*Histoplasma* monoclonais imobilizados no fundo dos micropoços 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 micropoços 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 micropoço. Após o período de incubação, os micropoços são lavados para remoção de qualquer resíduo 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 micropoços. 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 óptica (absorbância) é determinada por uma leitora de microplacas a 450 nm e uma leitura num comprimento de onda referencial a 620/630 nm.

EXPLICAÇÃO DOS DOIS PROCEDIMENTOS

O HGM201 tem dois procedimentos de teste utilizando amostras de urina: o procedimento de curva-padrão (Padrão Curve Procedure – ajuste de curva de 4 parâmetros ou ajuste linear) 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 um controle em branco. Os resultados deste procedimento são em ng/mL.

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

REAGENTES INCLUÍDOS

REAGENTE	N.º REF.	QTD	DESCRIÇÃO	Símbolo do Rótulo	Símbolo de Perigo
Microwell Plate	HGMMW2	96 ea	Uma placa de com tiras de micropoços de poliestireno quebráveis com anticorpos monoclonais anti- <i>Histo</i> imobilizados no fundo.		N/A
20X Wash Buffer	EIAWB1	50 mL	Tampão de lavagem concentrado contendo uma substância preservativa.		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.		
Positive Control	HGMPC2	1 mL	Galactomanana de <i>Histoplasma</i> em uma solução proteica tamponada contendo uma solução preservativa.		
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 preservativa.		N/A
TMB Substrate	EIATUS	10 mL	Solução tamponada contendo Tetrametil Benzidina (TMB)		N/A
Stop Solution	EIASS2	10 mL	Ácido metanossulfônico.		

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

REAGENTE	N.º REF.	QTD	DESCRIÇÃO	Símbolo do Rótulo	Símbolo de Perigo
<ul style="list-style-type: none"> • Todos os componentes do kit HGM201 devem ser armazenados de 2 a 8 °C até a data de validade (especificada na etiqueta). Todos os reagentes devem ser armazenados a 2 a 8 °C imediatamente após o uso. • Os micropoços (1) não utilizados devem permanecer no envelope térmico e fechado imediatamente após aberto e armazenado de 2 a 8 °C. É importante que o dessecante permaneça dentro do envelope com os micropoços 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 a 8 °C enquanto estiver fora de uso. Inspeção visualmente o tampão de lavagem para averiguar qualquer sinal de contaminação microbiana antes de cada uso. 					
PREPARAÇÃO DE REAGENTES					
<p>Todo o kit, incluindo a placa de micropoços, deve estar entre 20 e 25 °C antes e durante o uso.</p> <p>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).</p>					

*Consulte a FDS do HGM201 para maiores informações sobre perigos e advertências.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Pipeta capaz de dispensar entre 100-500 µL e ponteiros descartáveis
- Água destilada ou desmineralizada
- Leitor de microplacas capaz de ler absorbâncias em 450 e 620/630 nm com software capaz de gerar ajuste de curva de quatro parâmetros ou ajuste linear
- Máquina de lavagem de microplacas de teste ELISA, ou pipeta multicanal para lavagem
- Cronômetro
- Misturador de Vórtice
- Incubadora configurada para 37 °C (±1 °C)
- Cilindro graduado para diluir o Tampão de Lavagem
- Recipiente para resíduos de risco biológico

PRECAUÇÕES COM OS REAGENTES

- Para produzir os nossos reagentes e materiais de alta qualidade é necessária padronização específica.
- O usuário assume total responsabilidade por qualquer modificação dos procedimentos listados neste documento.
- Não utilize o kit ou quaisquer reagentes do kit após a data de validade indicada.
- No momento de cada uso, os componentes do kit devem ser inspecionados visualmente e descartados caso seja observado sinais óbvios de contaminação microbiana, vazamentos ou danos físicos significativos à microplaca.
- A IMMY não garante o desempenho 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. O uso de outros produtos com este teste não foi avaliado e pode resultar em resultados incorretos.
- Evite contato com a Solução reveladora (ácido metanossulfônico). Caso haja contato com os olhos, lave-os imediatamente com água corrente em abundância.
- Os seguintes reagentes (devidamente rotulados) são associados com os seguintes perigos:

Para usuários localizados na União Europeia, os seguintes pictogramas e perigos se aplicam:

Stop Solution (N.º REF.: EIASS2)



PERIGO

H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P264	Lavar mãos, antebraços, e rosto cuidadosamente após manuseamento.

P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P303 + P361 + P353	SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água ou tomar um duche.
P305 + P351 + P338	SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.
P310	Contacte imediatamente um Centro de Informação de Antivenenos, ou médico.
P501	Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com as legislações locais.

Standard (N.º REF.: HGM100) e Positive Control (N.º REF.: HGMPC2)



AVISO

H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
H412	Nocivo para a vida aquática com efeitos duradouros.
P261	Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P272	A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P302 + P352	SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE: lavar abundantemente com água
P333 + P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362 + P364	Retirar a roupa contaminada e lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.
P501	Eliminar o conteúdo/recipiente em um ponto de coleta de resíduo perigoso/especial de acordo com as legislações locais.

Negative Control (N.º REF.: HGMNC2)

H412	Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.
P273	Evitar a libertação para o ambiente.
P501	Eliminar o conteúdo/recipiente em um ponto de coleta de resíduo perigoso/especial de acordo com as legislações locais.

Para usuários localizados fora da União Europeia, os seguintes pictogramas e perigos se aplicam:

Stop Solution (N.º REF.: EIASS2)



PERIGO

H314	Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves.
H318	Provoca lesões oculares graves.

P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P264	Lavar mãos, antebraços, e rosto cuidadosamente após manuseamento.
P280	Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.
P301 + P330 + P331	EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.
P303 + P361 + P353	SE ENTRAR EM CONTATO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água ou tomar um duche.
P304 + P340	EM CASO DE INALAÇÃO: retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.
P305 + P351 + P338	SE ENTRAR EM CONTATO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.
P310	Contacte imediatamente um Centro de Informação de Antivenenos, ou médico.
P363	Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.
P405	Armazenar em local fechado à chave.
P501	Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com as legislações locais.

ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES AOS USUÁRIOS

- A. Apenas para utilização em diagnóstico in vitro.
- B. Evite respingos durante o processo de transferência/remoção de reagentes de/para os poços, pois isso pode causar resultados errôneos.
- C. Lavagem ou incubação inadequada podem causar excesso de reatividade no plano de fundo de qualquer protocolo de ensaio imunoenzimático.
- D. Utilize apenas os protocolos descritos nesta bula. Tempos de incubação ou temperaturas diferentes dos especificados podem gerar erros.
- E. Mantenha um padrão apropriado de técnicas de pipetagem durante todo o procedimento do teste para garantir resultados otimizados e reprodutíveis.
- F. Prepare o tampão de lavagem *medindo* uma parte de concentrado (Tampão de Lavagem 20X) para 19 partes de água desionizada e misturando bem.

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 a 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 72 h 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	<p>Separe uma quantidade suficiente de reagentes para os testes sendo realizados neste dia, e armazene o restante dos reagentes entre 2-8 °C</p> <p>(OBS: Quando for separar o Substrato TMB (5), proteja o reagente da luz)</p>
Passo 2	Mantenha todos os componentes do kit entre 20-25 °C
Passo 3	<p>Prepare os padrões/calibrador para o procedimento que irá realizar: Procedimento de Curva-Padrão (Tabela A) ou Procedimento de Corte baseado no Calibrador (Tabela B).</p> <p>(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.)</p>
Passo 4	<p>Quebre a quantidade suficiente de Micropoços 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.</p> <p>(OBS: Armazene os micropoços não utilizados ao envelope térmico com o dessecante e armazene entre 2-8 °C)</p>
Passo 5	<p>Adicione 100 µL dos seguintes reagentes aos micropoços:</p> <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 micropoços e descarte-os em um receptáculo para materiais de risco biológico, trocando de ponteira entre cada micropoço
Passo 9	<p>Encha todos os micropoços com o Tampão de Lavagem 1x (2 já diluído), utilizando uma máquina de lavagem de ELISAs, ou com uma pipeta multicanal e esvazie o conteúdo da placa após encher todos os micropoços, utilizando um dos métodos a seguir:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Encha todos os micropoços com 370 µL do Tampão de Lavagem 1x e despeje. Repita por 3 vezes ao todo. 2. Encha todos os micropoços com 300 µL do Tampão de Lavagem 1x e despeje. Repita por 5 vezes ao todo.
Passo 10	Após a última lavagem, bata com a placa (micropoços 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 micropoços
Passo 11	Adicione 100 µL do conjugado (4) em cada micropoço e repita o passo 6 quando todos os micropoços estiverem com conjugado.
Passo 12	Incube a placa em 37 ± 1 °C por 45 minutos ± 5 minutos
Passo 13	Repita os passos 8-10
Passo 14	<p>Adicione 100 µL do Substrato (5) em cada micropoço. Inicie um cronômetro de 30 minutos quando o substrato (5) for adicionado ao primeiro micropoço.</p> <p>Repita o passo 6 após adicionar substrato a todos os micropoços 5</p>
Passo 15	Incube a placa em 37 ± 1 °C pelo restante dos 30 minutos (± 1 minuto) cronometrados no passo 14.
Passo 16	Adicione 100 µL da Solução Reveladora (6) em cada micropoço na mesma ordem que no passo 14.
Passo 17	Leia a placa e recorde os resultados (OBS: 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

Frasco	Padrão (ng/mL)	Volume do Padrão	Volume do Tampão 1X 2
B	12,5	500 μ L Frasco A	500 μ L
C	6,25	500 μ L Frasco B	500 μ L
D	3,1	500 μ L Frasco C	500 μ L
E	1,6	500 μ L Frasco D	500 μ L
F	0,8	500 μ L Frasco E	500 μ L
G	0,4	500 μ L Frasco F	500 μ L

TABELA B: REAGENTES DO CORTE BASEADO NO CALIBRADOR

Tube	Calibrador (ng/mL)	Volume do Padrão	Volume do Tampão 1X 2
A	25	250 μ L 3	750 μ L
B	12,5	500 μ L Frasco A	500 μ L

INTERPRETAÇÃO DO TESTE

- Misture gentilmente batendo levemente na lateral da placa ou mexendo a placa em um balcão por 1-5 segundos.
- Cuidadosamente, seque a parte de baixo dos micropoços com um tecido sem fiapos e meça a absorbância de cada micropoço de acordo com o procedimento listado na próxima página:
 - Um leitor de duplo comprimento de onda é necessário, com leitura em absorbâncias em 450 nm e 620/630 nm. O branco deve ser marcado no Tampão de Lavagem 1X **2**. Este teste não foi validado em leitores de comprimento de onda único.
- Descarte os materiais utilizados no teste como resíduos perigosos e guarde a placa de testes vazia (sem micropoços).
- Desinfete a placa de testes com um desinfetante equivalente a:
 - Uma solução de 10% de cloro
 - Etanol a 70%
 - 1% Lysol I.C.TM

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

CONTROLE DE QUALIDADE E RESULTADOS

A. O controle de qualidade 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. A curva-padrão deve ser executada a cada teste. A curva-padrão não pode ser armazenada para testes futuros.

B. PROCEDIMENTO DE CURVA-PADRÃO – AJUSTE DE QUATRO PARÂMETROS

PADRÃO	VALORES ACEITÁVEIS
25	1,000 – 2,700 DO Anulada
12,5	0,500 – 1,350 DO Anulada
6,25	0,250 – 0,675 DO Anulada

PADRÃO	VALORES ACEITÁVEIS
3,1	0,125 – 0,340 DO Anulada
1,6	0,060 – 0,170 DO Anulada
0,8	0,030 – 0,085 DO Anulada
0,4	0,011 – 0,045 DO Anulada
PC	3,5 – 7,5 ng/mL
NC	<0,2 ng/mL
Tampão de Lavagem 1x (2)	DO Natural <0,120
R ²	Ajuste de Quatro Parâmetros ≥0,990

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. Trace os valores da curva-padrão utilizando a seguinte tabela:

ng/mL (Eixo-X)	ABSORBÂNCIA (Eixo-Y)
25	Média dos micropoços (25 ng/mL)
12,5	Média dos micropoços (12,5 ng/mL)
6,25	Média dos micropoços (6,25 ng/mL)
3,1	Média dos micropoços (3,1 ng/mL)
1,6	Média dos micropoços (1,6 ng/mL)
0,8	Média dos micropoços (0,8 ng/mL)
0,4	Média dos micropoços (0,4 ng/mL)

iii. **Utilizando um software de espectrofotômetro**, calcule um ajuste de curva de quatro 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	VALORES CALCULADOS
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 absorvância 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 CURVA-PADRÃO – AJUSTE LINEAR

PADRÃO	VALORES ACEITÁVEIS
25	1,000 – 2,700 DO Anulada
12,5	0,500 – 1,350 DO Anulada
6,25	0,250 – 0,675 DO Anulada
3,1	0,125 – 0,340 DO Anulada
1,6	0,060 – 0,170 DO Anulada
0,8	0,030 – 0,085 DO Anulada
0,4	0,011 – 0,045 DO Anulada
PC	3,5 – 7,5 ng/mL
NC	<0,2 ng/mL

PADRÃO	VALORES ACEITÁVEIS
Tampão de Lavagem 1x (2)	DO Natural <0,120
R ²	Ajuste Linear ≥0,990
Intercepção Y	-0,025 – 0,030

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

1. Controle de Qualidade

O teste é considerado válido quando os padrões, controle positivo (PC), controle negativo (NC), R² e intercepção Y estão dentro dos intervalos aceitáveis, conforme definido nas tabelas acima.

O Controle Positivo, o Controle Negativo e os padrões devem ser incluídos em cada testagem de amostras de pacientes para assegurar a garantia da qualidade dos reagentes. Os controles Positivo e Negativo visam monitorar falhas substanciais dos reagentes de teste. O Controle Positivo não deve ser utilizado como um indicador da precisão dos padrões e apenas garante a funcionalidade do reagente.

Se a concentração do Controle Positivo e/ou Controle Negativo não estiver dentro dos parâmetros acima, os resultados dos testes dos pacientes devem ser considerados inválidos e a testagem deve ser repetida.

Controles adicionais podem ser testados de acordo com diretrizes ou requisitos de regulamentações locais, estaduais e/ou federais ou organizações credenciadoras.

2. Resultados:

Calcule a concentração (ng/mL) de acordo com os seguintes passos:

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

ng/mL (Eixo-X)	ABSORBÂNCIA (Eixo-Y)
25	Média dos micropoços (25 ng/mL)
12,5	Média dos micropoços (12,5 ng/mL)
6,25	Média dos micropoços (6,25 ng/mL)
3,1	Média dos micropoços (3,1 ng/mL)
1,6	Média dos micropoços (1,6 ng/mL)
0,8	Média dos micropoços (0,8 ng/mL)
0,4	Média dos micropoços (0,4 ng/mL)

- iii. Utilizando o software do espectrofotômetro, ou outros meios apropriados, calcule um ajuste linear:

$$Y = mx + b$$

iv. As concentrações do paciente são calculadas substituindo os valores de absorvância (DO anulada). Veja abaixo:

EXEMPLO DE RESULTADOS E CÁLCULOS*:

PARÂMETROS DE AJUSTE LINEAR	VALORES CALCULADOS
m (declive)	0,0731
b (intercepção em Y)	0,0232

Usando a equação da curva-padrão mostrada acima, para uma amostra que fornece uma absorvância de DO anulada de 0,695, a concentração seria calculada da seguinte forma:

$$0.695 = 0.0731x + 0.0232$$

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

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

$$9.19 \text{ ng/mL} = \frac{0.695 - 0.0232}{0.0731}$$

**Estes números são apenas exemplos para fins de demonstração, não use esses números para seus próprios cálculos.*

D. PROCEDIMENTO DE CORTE BASEADO NO CALIBRADOR

CONTROLE	VALORES ACEITÁVEIS
Padrão 12,5	DO Anulada 0,500 – 1,350
PC	2,5 – 7,0 Unidades EIA
NC	<1,0 Unidades EIA
Tampão de Lavagem 1x (2)	DO 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 12,5 ng/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 12,5 ng/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 enquadrarem 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 DESEMPENHO

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 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 que Antígenos de Imunodifusão foram utilizados na avaliação devido à falta de amostras de pacientes disponíveis para o teste de desempenho

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 copositividade e conegatividade.

Os resultados da análise seguem nas tabelas abaixo:

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

	Calculado	95% CI
% Concordância Positiva	82,76%	70,57%-91,41%
% Concordância Negativa	84,02%	78,48%-88,61%

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 copositividade e conegatividade excluindo estes casos:

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

	Calculado	95% CI
% Concordância Positiva	82,76%	70,57%-91,41%
% Concordância Negativa	98,92%	96,17%-99,87%

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 cinco 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 (ng/mL)	Desvio Padrão	% Coeficiente de Variação
Urina Positiva Alta	26,398	1,179	4,466
Urina Positiva Média	7,156	0,308	4,298
Urina Positiva Baixa	1,262	0,154	12,165
Urina Neg. 1	0,000	0,000	0,000

Concentração			
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 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 que Antígenos de Imunodifusão foram utilizados na avaliação devido à falta de amostras de pacientes disponível para o teste de desempenho 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 copositividade e conegatividade. Os resultados da análise seguem nas tabelas abaixo:

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

	Calculado	95% CI
% Concordância Positiva	81,03%	68,59%-90,13%
% Concordância Negativa	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 positividade e conegatividade excluindo estes casos:

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

	Calculado	95% CI
% Concordância Positiva	81,03%	68,59%-90,13%
% Concordância Negativa	99,47%	97,09%-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 cinco 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 (Unidad es EIA)	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 DO TESTE

- O HGM201 é destinado ao uso com amostras de urina. O desempenho deste teste com outros tipos de amostras ainda não foi estabelecido.
- Somente o volume necessário de reagentes para a realização da quantidade de micropoços sendo utilizados no dia de teste deve ser aquecido à temperatura ambiente. O desempenho dos reagentes não foi determinado caso os reagentes sejam expostos 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.
- O desempenho do “clarus Histoplasma Galactomannan EIA” não foi estabelecido 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 marneffeii, a reatividade cruzada com tal organismo já foi experienciada em anticorpos de Histoplasma.
- O desempenho do “clarus Histoplasma Galactomannan EIA” é desconhecido 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
Varição entre resultados de réplicas da mesma amostra	<ul style="list-style-type: none">• Prepare os padrões, controles e amostras em uma placa de 96 micropoços nova, limpa e sem anticorpos/antígenos imobilizados nos micropoços.• Use uma pipeta multicanal para transferir os conteúdos da placa de 96 micropoços para a placa de testes do kit HGM201 (1)
Suspeita de contaminação dos micropoços	<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 micropoços adjacentes.• Troque ponteiras das pipetas entre cada micropoço.
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 entre 20-25 °C antes de iniciar o teste.• Armazene os reagentes em um ambiente com controle de temperatura (por exemplo, uma incubadora) quando estiver aquecendo os reagentes a 20-25 °C. Isto pode ser feito colocando os reagentes numa incubadora a 20-25 °C durante 30 minutos ou numa incubadora a 37 °C durante 10 minutos.
Efeitos de limiar?	<ul style="list-style-type: none">• O impacto dos efeitos de limiar foram determinados como insignificantes
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	REF	Número de referência
	Consulte as instruções de uso	LOT	Número de Lote
	Fabricante	IVD	Para uso em diagnóstico in vitro
	Data de Validade	EC REP	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Limitações de Temperatura	CONTROL	Controle
CE	Marca CE de conformidade		Uso único
Rx ONLY	Uso somente sob prescrição médica		

BIBLIOGRAFIA

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