


clarus
ASPERGILLUS GM
ENZ YME IMMUNOASSAY

For the Qualitative Detection of *Aspergillus* Galactomannan – REF AGM101

R_x ONLY

IVD

For In Vitro
Use Only

2°C  8°C



UTILISATION PRÉVUE

Le clarus *Aspergillus* Galactomannan EIA (AGM EIA) est un test immunoenzymatique non automatisé sur microplaque sandwich utilisé pour la détection qualitative de *Aspergillus* galactomannane dans des échantillons de sérum et de lavage bronchoalvéolaire (BAL) de patients à risque d'aspergillose invasive.

Le clarus AGM EIA est un test qui, lorsqu'il est 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, peut être utilisé comme une aide au diagnostic de l'aspergillose. Il est destiné à un usage professionnel en laboratoire.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

Les *Aspergillus* spp. sont des champignons filamenteux omniprésents dans le monde entier qui peuvent se développer aussi bien en intérieur qu'en extérieur. L'aspergillose invasive (AI) est causée par l'inhalation de ces spores fongiques. L'AI est l'une des menaces les plus importantes pour les receveurs de greffes de cellules souches hématopoïétiques et d'organes solides. Les personnes dont le système immunitaire est affaibli en raison de maladies telles que l'infection par le VIH/SIDA courent également un risque élevé¹⁻³. Les facteurs de risque non traditionnels qui ont été identifiés plus récemment pour l'AI comprennent les séjours en unité de soins intensifs et les infections virales respiratoires⁴. Une augmentation significative de l'incidence de l'AI a été observée au cours des deux dernières décennies en raison de l'utilisation généralisée de traitements pour certaines de ces pathologies, telles que la chimiothérapie et les agents immunosuppresseurs^{5,6}. Il a été rapporté que les infections à *Aspergillus* représentent jusqu'à 41 % des infections chez tous les patients transplantés et présentent un taux de mortalité stupéfiant allant jusqu'à 92 % au sein de cette population². L'AI est difficile à diagnostiquer, ce qui nécessite une approche multidimensionnelle qui inclut les caractéristiques du patient, les résultats cliniques et radiologiques et les preuves mycologiques⁷⁻⁹. La détection et le traitement précoces de l'infection sont essentiels pour réduire la mortalité associée à cette maladie^{10,11}.

Le clarus AGM EIA est un test immunoenzymatique non automatisé sur microplaque sandwich qui détecte l'*Aspergillus* galactomannane dans les échantillons de sérum et de BAL. Le clarus AGM EIA est un test qui, lorsqu'il est 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, peut être utilisé comme une aide au diagnostic de l'aspergillose.



PRINCIPES BIOLOGIQUES

Le clarus AGM EIA est un test immunoenzymatique non automatisé sur microplaque sandwich qui détecte l'*Aspergillus* galactomannane dans le sérum et le BAL. Les échantillons de sérum et de BAL nécessitent un prétraitement thermique avant le test. Après le prétraitement, le surnageant de l'échantillon et des contrôles est pipeté dans des micropuits revêtus d'anticorps anti-*Aspergillus*. Les micropuits subissent une incubation à 37 °C puis sont lavés avant l'ajout du conjugué. Après une seconde incubation (37 °C) et un lavage, du tétraméthylbenzidine (TMB) 3,3', 5,5' est ajouté. Les micropuits

subissent une incubation finale (37 °C) puis une solution d'arrêt est ajoutée. Le clarus AGM EIA peut être exécuté en moins de 3 heures et les résultats sont lus dans les 15 minutes suivant la fin du test.

Des anticorps monoclonaux anti-*Aspergillus* IgG sont liés à des microplaques et utilisés comme anticorps de capture. Les anticorps monoclonaux anti-*Aspergillus* IgG conjugués à la peroxydase de raifort (HRP) sont utilisés comme réactifs de détection. Le galactomannane est un polysaccharide présent dans la paroi cellulaire. Si l'échantillon du patient contient de l'*Aspergillus* galactomannane, ces antigènes se lieront aux anticorps de capture sur les micropuits. Avant l'ajout du conjugué, les micropuits sont lavés, ce qui élimine tout antigène non lié du puits. Cela réduit le risque de résultats faussement négatifs en raison de l'effet crochet à forte dose. Une fois le conjugué ajouté, le complexe anticorps-antigène de capture se lie aux anticorps de détection liés à la HRP dans la solution de conjugué. Les micropuits sont lavés une deuxième fois pour éliminer tout matériau non lié. Si l'antigène est présent dans l'échantillon du patient, une couleur bleue se développe avec l'ajout de TMB. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'arrêt, où une coloration jaune se développe. La densité optique (DO) est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 450 nm et une longueur d'onde de référence de 620/630 nm. Les valeurs de DO corrigées sont calculées puis supprimées avant le calcul des unités EIA.

RÉACTIFS FOURNIS

REACTIF	N° de RÉF	QTÉ	DESCRIPTION	Symbole d'étiquette	Symbole de danger
Plaque de micropuits	AGMMW1	96 micropuits	1 plaque à 96 puits, revêtus d'anticorps IgG monoclonaux anti- <i>Aspergillus</i> , emballée dans un sac Mylar avec une poche déshydratante	1	S.O.
Tampon de lavage 20X	AGMWB2	50 ml	Tampon de lavage 20X EIA ; contient 0,4 % de Tween20, 0,2 % de ProClin	2	S.O.
Tampon de prétraitement	AGMSTB	10 ml	Contient une solution EDTA à 4 %, 0,2 % de ProClin	3	
Seuil du calibrateur	AGMCC1	1,5 ml	1-5 ng/ml d'Asp. galactomannane dans une solution de BSA ; contient <0,2 % de ProClin	4	S.O.
Contrôle positif	AGMPC1	1,5 ml	5-15 ng/ml d'Asp. galactomannane dans une solution de BSA ; contient <0,2 % de ProClin	+	S.O.
Contrôle négatif	AGMNC1	1,5 ml	La solution BSA contient <0,2 % de ProClin	-	S.O.
Conjugué	AGMDA1	10 ml	<0,3 mg/ml d'anticorps <i>Aspergillus</i> conjugués à la HRP	5	S.O.
Substrat	EIATUS	10 ml	Solution tamponnée contenant du tétraméthylbenzidine (TMB)	6	S.O.
Solution d'arrêt	EIASS2	10 ml	<5 % d'acide méthanesulfonique	7	

STOCKAGE ET STABILITE DES REACTIFS

- L'ensemble du kit de test AGM EIA 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.
- Éviter une exposition prolongée du substrat (6) à la lumière.
- Les micropuits inutilisés (1) 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.
- Un tampon de lavage 1X (2 dilué à 1X) peut être utilisé pendant 14 jours s'il est conservé entre 2 et 30 °C lorsqu'il n'est pas utilisé. Vérifiez toujours les signes évidents de contamination à chaque nouveau jour de test.

PREPARATION DES REACTIFS

- L'ensemble du kit, y compris les bandes de la plaque de micropuits (1), doit être maintenu entre 18 et 25 °C avant et pendant l'utilisation. Détachez suffisamment de bandes pour être testées ce jour-là et remettez les bandes inutilisées dans le sac refermable (voir ci-dessus).
- Préparez une solution 1X de tampon de lavage en mélangeant 19 volumes d'eau DI avec 1 volume d'AGMWB2 (2). Utilisez le tampon de lavage 1X comme blanc.
- AGMCC1 (4), AGMPC1 (+), et AGMNC1 (-) doivent être traités avec AGMSTB (3). Le blanc n'est pas traité.
- Les réactifs suivants sont prêts à l'emploi : AGMSTB (3), AGMDA1 (5), EIATUS (6) et EIASS2 (7).

PRECAUTIONS CONCERNANT LES REACTIFS

- A. 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.**
- B. L'utilisateur assume l'entière responsabilité de toute modification des procédures publiées ici. Utilisez uniquement les protocoles décrits dans cette notice. Les durées d'incubation ou les températures autres que celles spécifiées dans la procédure ci-dessous n'ont pas été évaluées et peuvent produire des résultats inexacts.
- C. N'utilisez pas le kit ou les réactifs du kit après la date de péremption indiquée.
- D. Le tampon de prétraitement (N° de RÉF : AGMSTB) et la solution d'arrêt (N° de RÉF : EIASS2) sont étiquetés :



H319	Provoque une sévère irritation des yeux.
P264	Se laver soigneusement les mains après manipulation.
P280	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
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.
P337 + P317	Si l'irritation oculaire persiste, consulter un médecin.
H402	Nocif pour la vie aquatique.
P273	Éviter le rejet dans l'environnement.
P501	Éliminer le contenu/récipient conformément aux réglementations locales.
H290	Peut être corrosif pour les métaux.
P234	Conserver uniquement dans le récipient d'origine.

P390	Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.
P406	Stocker dans un récipient résistant à la corrosion avec doublure intérieure résistant à la corrosion.

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.

AVERTISSEMENTS À L'INTENTION DES UTILISATEURS

- A. **Pour usage diagnostique *in vitro* uniquement.**
- B. Sur prescription uniquement
- C. Portez des vêtements de protection, y compris une blouse de laboratoire, une protection oculaire/ faciale et des gants jetables, et manipulez les réactifs du kit et les échantillons de patients conformément aux bonnes pratiques de laboratoire requises. Lavez-vous soigneusement les mains après avoir effectué le test.
- D. Maintenez des techniques et un schéma de pipetage appropriés tout au long de la procédure pour garantir des résultats optimaux et reproductibles.
- E. Évitez les éclaboussures lors de la distribution ou de l'aspiration des réactifs dans les micropuits car cela provoque des erreurs.
- F. Les déversements biologiques doivent être soigneusement essuyés avec un désinfectant efficace. Les désinfectants qui peuvent être utilisés incluent (mais ne sont pas limités à) une solution d'eau de Javel à 10 %, d'éthanol à 70 % ou de Wescodyne Plus™ à 0,5 %. Les matériaux utilisés pour essuyer les déversements peuvent nécessiter une élimination comme déchets biologiques dangereux.
- G. Un lavage inadéquat peut entraîner une réactivité de fond excessive dans tout protocole EIA.
- H. Éliminez tous les échantillons et matériaux utilisés pour effectuer le test comme s'ils contenaient un agent infectieux. Les déchets chimiques et biologiques dangereux du laboratoire doivent être manipulés et éliminés conformément à toutes les réglementations locales, régionales et nationales.
- I. Évitez tout contact avec la solution d'arrêt (acide méthanesulfonique). En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer immédiatement à grande eau.
- J. Reportez-vous aux sections Dangers et Précautions d'emploi pour les dangers associés à des réactifs spécifiques. Les fiches de données de sécurité sont disponibles sur demande.

PRECAUTIONS A L'INTENTION DES UTILISATEURS

- A. Ce test doit être effectué uniquement par des utilisateurs professionnels de laboratoire dûment formés.
- B. **LES ÉCHANTILLONS CONGELÉS DE SÉRUM OU DE BAL STOCKÉS DANS DES CONDITIONS INCONNUES PEUVENT DONNER DE FAUX RÉSULTATS POSITIFS EN RAISON D'UNE CONTAMINATION PAR DES CHAMPIGNONS ET/OU DES BACTÉRIES.**
- C. N'utilisez pas le kit ou les réactifs du kit après la date de péremption indiquée.

- D. Utilisez des matériaux propres et exempts de poussière pour minimiser les risques de contamination par des spores d'*Aspergillus* provenant de l'environnement. Le galactomannane étant thermostable, la stérilisation du matériel utilisé ne garantit pas l'absence d'antigène contaminant. Les matériaux apyrogènes sont optimaux, mais un matériau standard peut être utilisé avec des précautions adéquates.
- E. Ne versez pas de réactif inutilisé dans le contenant d'origine.
- F. Maintenez des techniques et un schéma de pipetage appropriés tout au long de la procédure pour garantir des résultats optimaux et reproductibles. Lors du pipetage des contrôles et des échantillons, utilisez des embouts de pipette individuels pour éviter le transfert d'échantillons.
- G. Limitez l'exposition à l'air des échantillons et des composants du kit (sérums, liquide BAL, tampons, contrôles) ou des contenants ouverts (plaques, tubes, embouts de pipette).
- H. N'utilisez aucun des micropuits ayant été stockés dans un sac Mylar ouvert, car l'exposition à l'humidité peut entraîner des résultats inexacts.
- I. Un lecteur à double longueur d'onde est nécessaire, avec des absorbances lues à 450 nm et 620/630 nm. Ce test n'a pas été validé avec un lecteur à longueur d'onde unique ou à toute autre longueur d'onde de référence.
- J. Ne vous fiez pas à la température affichée par les appareils de chauffage. La température du bloc chauffant/du bain-marie doit être confirmée par un thermomètre étalonné séparé pour évaluer indépendamment la température réelle de la chaleur. Une température de 120 °C doit être atteinte à l'intérieur du bloc chauffant et de 100 °C à l'intérieur du bain-marie.
- K. N'alternez pas entre les méthodes de traitement thermique. Une seule méthode doit être utilisée en fonction des capacités du laboratoire.
- L. Si vous utilisez un bain-marie comme méthode de traitement thermique, prenez les précautions requises pour éviter les brûlures.
- M. Prétraitez uniquement le nombre d'échantillons pouvant être installés de manière équilibrée dans la centrifugeuse. Évitez les retards de traitement pendant le prétraitement. Pour une réactivité optimale, les échantillons doivent être centrifugés **immédiatement**.
- N. Les résultats lus après la fenêtre de lecture de 15 minutes ne sont pas valides.
- O. Les résultats entre différents tests d'*Aspergillus* galactomannane ne peuvent pas être comparés.

PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Prélevez 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 potentiellement présents. L'utilisation d'échantillons autres que le sérum ou le BAL n'a pas été établie. Pour des résultats optimaux, des échantillons prélevés de manière aseptique doivent être utilisés.

Les échantillons en transit entre des laboratoires doivent être maintenus entre 2 et 8 °C. Traitez et testez les échantillons dès leur arrivée. En cas de retard dans le traitement des échantillons, un stockage jusqu'à 2 semaines à <-20 °C ou 10 jours entre 2 et 8 °C est autorisé. Pour un stockage plus long, conservez l'échantillon à -80 °C. Les échantillons peuvent être soumis à un maximum de 5 cycles de congélation/décongélation. Un échantillon très faiblement positif peut devenir négatif après stockage. Les

échantillons précédemment congelés doivent être soigneusement mélangés après décongélation avant le test. Les échantillons doivent être amenés à température ambiante avant le test (entre 18 et 25 °C).

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les contrôles de calibration, positifs et négatifs doivent être prétraités avant le test. Le blanc n'est pas prétraité avant le test. Tous les contrôles (AGMCC₁, AGMPC₁, AGMNC₁, Blanc) doivent être testés à chaque analyse. Les résultats d'AGMCC₁, d'AGMPC₁, d'AGMNC₁ et Blanc sont utilisés pour valider l'analyse (voir Contrôle qualité et résultats attendus). Traitez les contrôles appropriés pour chaque exécution en même temps que l'échantillon de sérum/BAL. **Deux méthodes de traitement thermique sont décrites ci-dessous. Une seule méthode doit être utilisée en fonction des capacités du laboratoire.** La réussite du test nécessite le strict respect de la température prescrite et de la capacité de l'équipement.

Prétraitement des contrôles, sérum et BAL :

1. Placez 100 µl de tampon de prétraitement (3) dans des microtubes à centrifuger thermorésistants, à capuchon, à vis, individuels (ou autres tubes avec verrouillage).
2. Ajoutez 300 µl d'AGMCC₁, AGMPC₁, AGMNC₁, de sérum frais ou de BAL dans chaque tube de prétraitement. Le blanc n'est pas prétraité.
3. Vissez fermement les capuchons pour empêcher l'ouverture pendant le chauffage et agitez les échantillons au vortex.
4. Traitez thermiquement tous les échantillons et les contrôles appropriés en utilisant **l'une des méthodes suivantes** en fonction des capacités du laboratoire* :
Option Bloc chauffant : Placez les tubes dans un bloc chauffant pendant 6 à 8 minutes à 120 °C.
OU
Option bain-marie : Placez les tubes dans un bain-marie pendant 6 à 8 minutes à 100 °C.
5. Retirez les tubes du bloc chauffant ou du bain-marie bouillant et placez-les **immédiatement** dans la centrifugeuse.
6. Centrifugez immédiatement l'échantillon pendant 5 minutes à 10 000-14 000 x g à température ambiante (18 à 25 °C).
7. Retirez les microtubes de la centrifugeuse et testez les surnageants en suivant la procédure de test. Si nécessaire, les échantillons (surnageant avec comprimé) et les contrôles prétraités peuvent être stockés entre 2 et 8 °C pendant 24 heures au maximum avant le test.

* Voir Précautions à l'intention des utilisateurs

PROCEDURE DE TEST

Étape 1

Aliquoter suffisamment de réactifs nécessaires pour les tests exécutés ce jour-là. Remettre les réactifs restants en stockage réfrigéré (2 à 8 °C).

Amener tous les réactifs aliquotés et le sac Mylar contenant la plaque de micropuits (1) à une température comprise entre 18 et 25 °C.

(REMARQUE : Lors de l'aliquotage du substrat (6), protéger le réactif de la lumière)

Étape 2	<p>Détacher suffisamment de bandes revêtues d'anticorps de capture de la plaque de micropuits (1) pour le contrôle positif (+), le contrôle négatif (-), le blanc (2 dilué à 1X), le seuil du calibrateur (4) et les échantillons de patients, puis les insérer dans le support de micropuits. Les micropuits non utilisés 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.</p> <p>Utilisez un micropuits pour le contrôle positif (+), un micropuits pour le contrôle négatif (-), un micropuits pour le blanc (2 dilué à 1X) et deux micropuits pour le seuil de calibrateur (4).</p> <p>Les contrôles appropriés doivent être traités avant le test. Ne pas traiter le blanc.</p>
Étape 3	<p>Préparer le tampon de lavage 1X (2 dilué à 1X avec de l'eau distillée ou déminéralisée). Il sera utilisé pour le blanc et le tampon de lavage.</p>
Étape 4	<p>Traiter les contrôles (AGMCC1 4, AGMPC1+, et AGMNC1-) et échantillons à l'aide du tampon de prétraitement (3) conformément aux instructions de « Prétraitement des contrôles, sérum et BAL » indiquées ci-dessus. Ne pas traiter le blanc.</p>
Étape 5	<p>Une fois le prétraitement et la préparation des échantillons terminés, ajouter 100 µL de ce qui suit aux différents micropuits :</p> <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 (-) • Seuil de calibrateur (4) - 2 puits • Échantillons de patients <p>Enregistrer la position de chaque contrôle, blanc et échantillon.</p>
Étape 6	<p>Couvrir la plaque avec un scellant de plaque, ou autres moyens pour empêcher l'évaporation, garantissant que toute la surface est recouverte et étanche.</p>
Étape 7	<p>Incuber la plaque à 37 °C ±1 °C pendant 60 minutes ±5 minutes.</p>
Étape 8	<p>Retirer le scellant de la plaque et, 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.</p>
Étape 9	<p>À l'aide d'un laveur de plaques EIA ou d'une pipette multicanal, remplir tous les micropuits avec 300 µl de tampon de lavage 1X (2) préparé à l'étape 3. Vider le contenu de la plaque après le remplissage. Répéter l'opération pour un total de 5 lavages.</p>
Étape 10	<p>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.</p>
Étape 11	<p>Ajouter 100 µl de conjugué (5) à chaque micropuits.</p>
Étape 12	<p>Couvrir la plaque avec un scellant à plaque ou autres moyens pour empêcher l'évaporation, en s'assurant que toute la surface est couverte et étanche.</p>
Étape 13	<p>Incuber la plaque à 37 °C ±1 °C pendant 30 minutes ±5 minutes.</p>
Étape 14	<p>Retirer le scellant de la plaque et, 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.</p>
Étape 15	<p>À l'aide d'un laveur de plaques EIA ou d'une pipette multicanal, remplir tous les micropuits avec 300 µl de tampon de lavage 1X (2) préparé à l'étape 3. Vider le contenu de la plaque après le remplissage. Répéter l'opération pour un total de 5 lavages.</p>

Étape 16	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 17	Ajouter 100 µl de substrat (6) à chaque micropuits. Démarrer un minuteur pendant 30 minutes (± 5 minutes) lorsque 6 est ajouté au premier micropuits.
Étape 18	Couvrir la plaque avec un scellant à plaque ou autres moyens pour empêcher l'évaporation, en s'assurant que toute la surface est couverte et étanche.
Étape 19	Incuber la plaque à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant le temps restant des 30 minutes du minuteur.
Étape 20	Retirer le scellant de plaque et ajouter 100 µL de solution d'arrêt (7) à chaque micropuits dans le même ordre qu'à l'étape 17.
Étape 21	Lire et enregistrer les résultats (voir « Lecture du test »). (REMARQUE : La lecture doit avoir lieu dans les 15 minutes.)

LECTURE DU TEST

- A. **Les résultats lus après la fenêtre de lecture de 15 minutes ne sont pas valides.**
- B. Mélangez en tapotant doucement le côté de la plaque ou en secouant sur le plan de travail pendant 1 à 5 secondes.
- C. Essuyez soigneusement le dessous des micropuits avec un tissu propre et non pelucheux.
- D. Lisez la densité optique de chaque micropuits à 450 nm et 620/630 nm. Contrôlez le blanc sur le tampon de lavage 1X (2 dilué à 1X).
1. Un lecteur à double longueur d'onde est nécessaire, avec des absorbances à 450 nm et 620/630 nm. Ce test n'a pas été validé avec un lecteur à longueur d'onde unique ou à toute autre longueur d'onde de référence.
- E. Les résultats doivent être lus dans les 15 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.
- F. Éliminez tout matériel de test utilisé comme déchet dangereux et conservez le support de micropuits.
- G. 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. 1% Lysol brand I.C.™

REMARQUE : Les *Calculs* et les *Résultats attendus* se trouvent sous « Contrôle qualité et résultats ».

MATERIEL FOURNI

Voir la section RÉACTIFS

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- A. Eau distillée ou déminéralisée, pour la dilution du tampon de lavage concentré
- B. Papier absorbant
- C. Minuteur

- D. Agitateur vortex
- E. Pipettes capables de fournir des plages de 100 à 300 µl et des embouts jetables
- F. Scellants de plaques ou autres moyens pour empêcher l'évaporation
- G. Microtubes à capuchon à vis pour centrifugeuse de 1,5 à 2,0 ml (IMMY N° de réf. SCT050 ou équivalent) capables de supporter une chaleur de 120 °C (bloc chauffant) ou de 100 °C (bain-marie bouillant) pour le traitement des échantillons
- H. Bloc chauffant pouvant atteindre 120 °C ou bain-marie pouvant atteindre 100 °C pour le traitement des échantillons
- I. Centrifugeuse de laboratoire pour tubes de 1,5 à 2,0 ml capables de supporter 10 000 à 14 000 g
- J. Incubateur réglé sur 37 °C
- K. Laveur de microplaques ou pipette multicanal pour le lavage
- L. Lecteur de microplaques capable de lire les absorbances à 450 et 620/630 nm

CONTRÔLE QUALITÉ ET RÉSULTATS

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 blanc (tampon de lavage 1X) se situent dans les plages acceptables, telles que définies dans les tableaux de la section *Résultats attendus*.

Le contrôle positif, le contrôle négatif, le seuil du calibrateur et le blanc doivent être inclus avec chaque lot d'échantillons de patients pour garantir la qualité des réactifs. Les contrôles positif et négatif sont destinés à contrôler une défaillance substantielle du réactif. Le contrôle positif ne doit pas être utilisé comme indicateur de précision. Si les résultats du contrôle positif et/ou du contrôle négatif et/ou du seuil du calibrateur et/ou du blanc 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 avec un nouveau jeu de contrôles et d'échantillons prétraités.

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. Calculs :

Calculez les unités EIA comme suit :

1. Calculez les DO corrigées des contrôles, des blancs et des échantillons de patients à partir des données brutes :

$$DO \text{ corrigées} = DO \text{ d'échantillon } 450 \text{ nm} - DO \text{ d'échantillon } 630 \text{ nm}$$

2. Calculez les DO à blanc des échantillons de contrôle, de blanc et de patient à partir des DO corrigées :

$$DO \text{ à blanc} = \text{Échantillon corrigé } DO - DO \text{ à blanc corrigée}$$

3. Calculez la valeur moyennée (moyenne) pour les deux micropuits de seuil du calibrateur à l'aide des DO à blanc.

4. Calculer les unités EIA des échantillons :

$$\text{Unités EIA} = \frac{\text{DO échantillon à blanc}}{\text{DO moyenne de seuil du calibrateur à blanc}}$$

3. Résultats attendus :

CONTRÔLES	VALEURS ACCEPTABLES
Seuil du calibrateur	DO à blanc 0,150 à 0,300
CP	Unités EIA 2,5 à 4,0
CN	Unités EIA $\leq 0,1$
Blanc	DO corrigée $\leq 0,06$

RÉSULTATS	UNITÉS EIA
Négatif	Unités EIA $< 0,20$
Positif	Unités EIA $\geq 0,20$

LIMITES

- A. Un résultat négatif n'exclut **pas** le diagnostic d'aspergillose.
- B. L'AGM101 est destiné à être utilisé avec des échantillons de sérum et de BAL. Ce test n'a pas été validé sur des échantillons autres que le sérum et le BAL.
- C. La performance des réactifs n'a pas été déterminée lorsqu'ils sont exposés à des fluctuations de température au-delà de celles requises par la procédure de test.
- D. Utilisez uniquement les protocoles décrits dans cette notice. Des durées d'incubation ou des températures autres que celles spécifiées peuvent donner des résultats inexacts.
- E. La performance de l'AGM101 n'a pas été établie pour la lecture manuelle et/ou la détermination visuelle des résultats.
- F. Un lavage inadéquat pendant la procédure de test peut entraîner une réactivité de fond excessive.
- G. 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.
- H. Les tests positifs doivent être confirmés dans les zones ou les groupes de patients où les organismes connus pour réagir de manière croisée avec *Aspergillus spp.* sont endémiques ou à risque. Une certaine réactivité croisée a été observée avec des échantillons positifs pour *Histoplasma* et doit donc être envisagée dans les zones endémiques, y compris certaines parties des États-Unis.
- I. L'AGM101 n'a pas été évalué pour la réactivité croisée à l'aide d'échantillons BAL.
- J. L'AGM101 n'a pas été évalué pour le potentiel d'interférence à l'aide d'échantillons BAL.
- K. L'AGM101 peut présenter une détection réduite du galactomannane chez les patients atteints de maladie granulomateuse chronique (CGD) et du syndrome de Job.^{12,13}

- L. Les organismes fongiques tels que *Talaromyces marneffeii*, *Candida*, *Blastomyces*, *Histoplasma* et *Cryptococcus* sont connus pour réagir de manière croisée avec d'autres dosages du galactomannane¹⁴. L'AGM101 n'a pas été évalué pour sa réactivité croisée avec d'autres champignons, à l'exception de *Histoplasma*.
- M. L'AGM101 n'a pas été évalué pour la réactivité croisée avec PLASMA-LYTE™. Il y a eu des rapports de réactions positives pour le galactomannane associé à PLASMA-LYTE™ dans plusieurs observations en raison de problèmes de réactivité croisée ou de contamination¹⁵⁻¹⁷. Par conséquent, toute administration de PLASMA-LYTE™ doit être prise en compte lors de l'interprétation des résultats de ce test.
- N. La réactivité croisée des échantillons de liquide BAL avec *Mycoplasma pneumoniae* ou des anesthésiques/lubrifiants utilisés pour engourdir la région du cou/de la gorge pour le processus d'aspiration n'a pas été évaluée.
- O. L'AGM101 n'a pas été évalué pour la réactivité croisée avec le lipoglycane bifidobactérien.¹⁸
- P. L'AGM101 n'est pas destiné à la surveillance du traitement.
- Q. L'utilisation d'un traitement antifongique actif contre les moisissures chez certains patients atteints d'aspergillose invasive peut entraîner une sensibilité réduite à l'AGM101.
- R. 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'aspergillose. Les tests doivent être effectués uniquement lorsque des preuves cliniques suggèrent le diagnostic d'aspergillose.
- S. Les résultats entre différents tests d'*Aspergillus* galactomannane ne peuvent pas être comparés.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

1. Valeurs attendues

La fréquence de l'aspergillose dépend de plusieurs facteurs, notamment la population de patients, le type d'établissement et l'épidémiologie. La prévalence attendue de l'aspergillose invasive chez les patients immunodéprimés peut varier de 5 à 20 %¹⁹.

2. Sensibilité analytique (C95)

La sensibilité analytique du clarus AGM EIA a été évaluée en dopant le sérum et le liquide BAL avec l'antigène *Aspergillus* galactomannane à 3,00 ng/ml et en testant des concentrations (1:2) diluées en série 8x. Chacune des concentrations sériques a été testée sur un minimum de 27 répétitions, tandis que les concentrations de liquide BAL ont été testées sur un total de 10 répétitions (chacune). La sensibilité analytique a été déterminée en trouvant l'intersection où 95 % des résultats étaient positifs et est d'environ 0,40 à 0,50 ng/ml pour le sérum et le liquide BAL.

3. Effet crochet à haute dose

L'effet crochet à haute dose a été évalué en interne en testant du sérum et du BAL humains dopés avec l'antigène *Aspergillus* GM sur le clarus AGM EIA. L'AGM EIA n'a pas montré d'effet crochet

complet (résultats faux négatifs) lors du test d'échantillons de sérum et de BAL contenant des concentrations extrêmement élevées (jusqu'à 260 µg/ml).

CONCENTRATION DE L'ÉCHANTILLON	UNITÉS EIA MOYENNES	RÉSULTAT
BAL 260 µg/ml	11,810	Positif
BAL 130 µg/ml	11,852	Positif
BAL 65 µg/ml	11,664	Positif
BAL 32 µg/ml	11,975	Positif
Sérum 260 µg/ml	12,487	Positif
Sérum 130 µg/ml	12,565	Positif
Sérum 65 µg/ml	12,633	Positif
Sérum 32 µg/ml	12,280	Positif

4. Interférence

Le clarus AGM EIA a été évalué pour le potentiel d'interférence sur le sérum hémolysé, ictérique et lipémique. Ces sérums ne présentent aucune interférence dans le test.

5. Réactivité croisée

Le clarus AGM EIA a été évalué pour la réactivité croisée avec un panel d'échantillons de sérum 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>Syphilis</i>	10	0 % (0/10)
<i>Toxoplasmose</i>	8	0 % (0/8)
<i>VHA</i>	10	0 % (0/10)
<i>ANA</i>	10	0 % (0/10)
<i>Rubéole</i>	10	0 % (0/10)
<i>VMC</i>	5	0 % (0/5)
<i>Facteur rhumatoïde</i>	10	0 % (0/10)
<i>Mycoplasme</i>	10	0 % (0/10)
<i>VHC</i>	10	0 % (0/10)
<i>Cancer</i>	15	0 % (0/15)
<i>Histoplasme**</i>	8	12 % (1/8)

* Types de cancer évalués : 1 x sarcome, 5 x lymphomes, 1 x neuroblastome, 5 x myélome, 1 x cancer du poumon et 1 x cancer du rein

** Le seul échantillon de sérum à réaction croisée *Histoplasma* était également positif sur un autre *Aspergillus* GM EIA disponible dans le commerce, avec un indice GM de 7,524, contre 0,498 unités EIA sur le clarus AGM101. Notamment, un deuxième échantillon de sérum *Histoplasma* était également positif (indice GM de 2,269) sur le même GM EIA disponible dans le commerce, ce qui a entraîné un taux de réactivité croisée d'*Histoplasma* de 25 % (2/8), contre 12 % pour le clarus AGM101.

6. Précision

La précision (reproductibilité) du clarus AGM EIA a été évaluée en exécutant des contrôles et un panel de trois échantillons de sérum et de quatre échantillons de BAL. Le panel d'échantillons a été testé une fois par jour pendant cinq jours au total, dans deux lots différents, par trois opérateurs (totalisant 30 évaluations par échantillon). Échantillons testés : Contrôles du test (AGMCC1, AGMPC1, AGMNC1, tampon de lavage/blanc 1x), deux positifs faibles (1x sérum, 1x BAL), deux positifs modérés (1x sérum, 1x BAL) et trois négatifs (1x sérum, 2x BAL).

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

TYPE D'ÉCHANTILLON	MOYENNE (UNITÉ EIA)	ET	% DE CV	% DE POSITIFS	% DE NÉGATIFS
Sérum Sérum positif	0,834	0,082	10 %	(30/30) 100 %	(0/30) 0 %
Sérum faiblement positif	0,443	0,041	9 %	(28/28) 100 %	(0/28) 0 %
BAL modérément positif	0,614	0,086	13 %	(30/30) 100 %	(0/30) 0 %
BAL faiblement positif	0,293	0,051	17 %	(30/30) 100 %	(0/30) 0 %
BAL négatif 1	0,039	0,037	S.O.	(0/30) 0 %	(30/30) 100 %
BAL négatif 2	-0,008	0,035	S.O.	(0/30) 0 %	(30/30) 100 %
Sérum négatif	0,003	0,038	S.O.	(0/30) 0 %	(30/30) 100 %

7. Comparaison de méthodes

Le clarus AGM EIA a été comparé à un *Aspergillus* GM antigène EIA disponible dans le commerce dans une étude externe utilisant des échantillons rétrospectifs. Un total de 319 échantillons (272 sérums, 47 BAL) ont été testés sur les deux tests. 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 :

<u>Sérum</u>		GM EIA	
		Pos.	Nég.
IMMY clarus AGA EIA	Pos.	32	1
	Nég.	13	226

<u>Fluide BAL</u>		GM EIA	
		Pos.	Nég.
IMMY clarus AGA EIA	Pos.	16	1
	Nég.	3	27

<u>Sérum</u>	Calculé	IC à 95 %
% de concordance pos.	71,1 %	56,6 à 82,3 %
% de concordance nég.	99,6 %	97,5 à 99,9 %

<u>Fluide BAL</u>	Calculé	IC à 95 %
% de concordance pos.	84,2 %	62,4 à 94,5 %
% de concordance nég.	96,4 %	82,3 à 99,4 %

8. Performance clinique

Une étude externe basée sur les critères cliniques EORTC/MSG 2020 pour l'AI a été réalisée pour déterminer la sensibilité et la spécificité du clarus AGM EIA en évaluant 290 échantillons rétrospectifs (254 sérums, 36 fluides BAL) de patients à risque d'AI. Les résultats de cette comparaison sont présentés dans les tableaux ci-dessous :

Sérum		EORTC/MSG	
		Prouvé/ probable	Pas d'AI
IMMY clarus	Pos.	32	0
Asp. GM EIA	Nég.	6	216

Sérum	Calculé	IC à 95 %
Sensibilité	84,2 %	69,6 %-92,6 %
Spécificité	100,0 %	98,3 %-100 %

Fluide BAL		EORTC/MSG	
		Prouvé/ probable	Pas d'AI
IMMY clarus	Pos.	14	1
Asp. GM EIA	Nég.	2	19

Fluide BAL	Calculé	IC à 95 %
Sensibilité	87,5 %	64,0 à 96,5 %
Spécificité	95,0 %	76,4 %-99,1 %














9. Procédures et matériaux de référence

Il n'y a pas de procédures ou de matériaux de mesure de référence disponibles pour l'utilisateur.

DÉPANNAGE

PROBLÈME	SOLUTION
Résultats variables selon les répétitions	<ul style="list-style-type: none"> • Configurer 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
Suspicion de contamination des micropuits	<ul style="list-style-type: none"> • Tapoter doucement 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
DO inférieures aux prévisions (Réactifs trop froids)	<ul style="list-style-type: none"> • S'assurer que tous les réactifs prennent une température située entre 18 et 25 °C avant le test

SYMBOLES

	Contenu suffisant pour <n> tests		Numéro de référence
	Consulter le mode d'emploi		Code de lot
	Fabricant		Pour usage diagnostique <i>in vitro</i> uniquement
	Date de péremption		Limite de température
	Contrôle positif		Marquage CE de conformité
	Contrôle négatif		Mandataire pour la Communauté européenne/Union européenne
	Usage unique		

BIBLIOGRAPHIE

1. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):545-61.
2. Singh N, and Paterson DL. Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):44-69.
3. Soubani AO, Qureshi MA. Invasive pulmonary aspergillosis following bone marrow transplantation: risk factors and diagnostic aspect. *Hématologia (Budap).* 2002;32(4):427-37.
4. Thompson GR 3rd, Young JH. *Aspergillus* Infections. *N Engl J Med.* 2021;385(16):1496-1509.
5. Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica.* 2006;91(7):986-9.
6. McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, et al. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis.* 2001;33(5):641-7.
7. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis.* 2008;46(12):1813-1821.
8. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 2020;71(6):1367-1376.
9. Patterson TF, Thompson GR 3rd, Denning DW, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2016;63(4):e1-e60.
10. Mercier T, Dunbar A, de Kort E, Schauwvlieghe A, Reynders M, Guldentops E, et al. Lateral flow assays for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in adult hematology patients: A comparative multicenter study. *Med Myc.* 2019;1-9.

11. van der Peppel RJ, Visser LG, Dekkers OM, de Boer MGJ. The burden of Invasive Aspergillosis in patients with haematological malignancy: A meta-analysis and systematic review. *Journal of Infect.* 2018;76(6):550-562.
12. Walsh T. J., R.L. Schaufele, T. Sein, J. Gea-Banacloche, et al. Reduced expression of galactomannan antigenemia in patients with Invasive Aspergillosis and chronic granulomatous disease or Job's syndrome. Presented at: 40th Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; October 2002; Arlington, VA. P. 105 ; Abstr. 345.
13. King J, Henriet SSV, Warris A. Aspergillosis in Chronic Granulomatous Disease. *J Fungi (Basel)*. 2016;2(2):15.
14. Min Z, Baddley JW, Rodriguez JM, Moser SA, Patel M. Cross-reactivity of *Aspergillus* galactomannan in an HIV-infected patient with histoplasmosis. *Med Mycol Case Rep*. 2012;1(1):119-122.
15. Hage CA, et al. Plasmalyte as a cause of false-positive results for *Aspergillus* GM in BAL Fluid. *J Clin Microbiol* 2007; 45:676-677.
16. Racil Z, et al. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of Platelia *Aspergillus* test for GM detection in serum. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3141-3142.
17. Spriet I, Lagrou K, Maertens J, Willems L, Wilmer A, Wauters J. Plasmalyte: No Longer a Culprit in Causing False-Positive Galactomannan Test Results. *J Clin Microbiol*. 2016;54(3):795-797.
18. Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, Klont RR, et al. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3925-3931.
19. Denning DW. Invasive Aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 1998; 26:781-803.


 IMMY, Inc.
 2701 Corporate Centre Drive
 Norman, OK 73069, États-Unis
 Tél. : (405) 360-4669/(800) 654-3639
 Fax : (405) 364-1058
 e-Mail : info@immy.com
 Web : www.immy.com



 MDSS
 Schiffgraben 41
 30175 Hannover, Germany