

Ensaio para (1→3)-β-D-Glucano em soro	
FUNGITELL® STAT	
<i>Instruções de utilização</i>	
<div><div><div><div><div></div><div>ASSOCIATES OF</div></div><div><div></div><div>CAPE COD</div></div></div><div><div><div></div><div>INCORPORATED</div></div></div></div></div> <div>124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA</div>	Telefone: (508) 540-3444 <p>Número gratuito: (888) 395-2221</p> Fax: (508) 540-8680 <p>Assistência técnica: (800) 848-3248</p> Serviço de apoio ao cliente: (800) 525-8378
<div><div><div></div><div>PN002603-pt Rev002</div></div></div>	<div><div><div></div><div>11-03-2020</div></div></div>

Visite **www.acciusa.com** para obter as instruções de utilização no seu idioma.

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O ensaio de Fungitell® STAT é um ensaio colorimétrico baseado em protease zimogénica para a deteção qualitativa de (1→3)-β-D-glucano no soro de pacientes com sintomas de, ou problemas de saúde que predisõem o paciente a, uma infeção fúngica invasiva. A concentração sérica de (1→3)-β-D-glucano, um importante componente da parede celular de vários fungos de importância médica¹, pode ser usada como auxiliar no diagnóstico de micoses e fungemias profundas². Um resultado positivo não indica que género de fungo pode estar a causar a infeção.

Os valores de índice de (1→3)-β-D-glucano devem ser utilizados em conjunto com outros procedimentos de diagnóstico como a cultura microbiológica, o exame histológico de amostras de biópsia e o exame radiológico.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

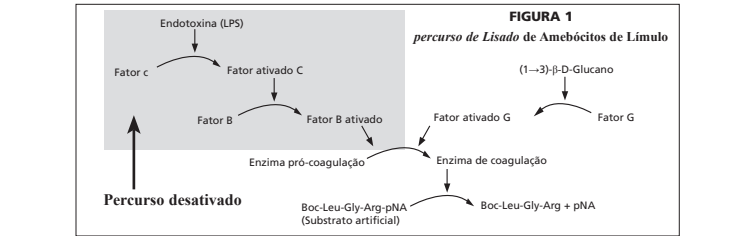
Há uma incidência crescente de infeções fúngicas por organismos patogénicos oportunistas, especialmente em pacientes imunocomprometidos^{3,4,5}. Doenças fúngicas invasivas, como as infeções oportunistas, são comuns entre pacientes com malignidade hematológica e SIDA, e representam um número crescente de infeções nosocomiais, especialmente entre recetores de transplante de órgãos e outros pacientes que recebem tratamentos imunossupressores^{6,7}. Muitas doenças fúngicas são adquiridas pela inalação de esporos fúngicos provenientes do solo, de detritos vegetais, de sistemas de tratamento do ar⁸ ou de superfícies expostas. Alguns fungos oportunistas estão presentes na pele humana, no trato intestinal e nas membranas mucosas⁹. O diagnóstico de micoses e fungemias invasivas baseia-se normalmente em técnicas de diagnóstico ou radiológicas não específicas. Recentemente, foram adicionados marcadores biológicos de infeção fúngica aos métodos de diagnóstico disponíveis¹.

Os organismos patogénicos fúngicos oportunistas incluem *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum*, e *Pneumocystis jirovecii*. O (1→3)-β-D-glucano produzido por esses e outros organismos pode ser detetado pelo ensaio de Fungitell® STAT^{3,10,11}.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O ensaio de Fungitell® STAT é uma modificação de design do formato do ensaio de Fungitell®. O ensaio de Fungitell® STAT foi desenvolvido para responder à necessidade de um formato de teste de utilização única e um tamanho de kit menor em relação ao formato de placa com 96 alvéolos do ensaio de Fungitell®.

O ensaio de Fungitell® STAT fornece uma medida qualitativa do (1→3)-β-D-glucano. O ensaio baseia-se numa modificação do percurso de Lisado de Amebócitos de Limulo (LAL)^{12,13,14,15}. **Figura 1.** O Reagente STAT de Fungitell® é modificado para eliminar a reatividade de endotoxinas bacterianas e, assim, reagir apenas ao (1→3)-β-D-glucano, através do lado do percurso mediado pelo Fator G. O (1→3)-β-D-glucano ativa o Fator G, uma protease zimogénica serina. O Fator G ativado converte a enzima pró-coagulação inativa na enzima de coagulação ativa que, por sua vez, divide a para-nitroamilina Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, criando um cromóforo, para-nitroanilina (pNA), que absorve a 405 Nm. O ensaio cinético de Fungitell® STAT, descrito abaixo, baseia-se na determinação do índice de aumento da densidade ótica produzida por uma amostra. Este índice é comparado com o índice de aumento da densidade ótica de Fungitell® STAT Standard para produzir um índice. Este valor de índice da amostra do paciente é interpretado qualitativamente como resultado Negativo, Indeterminado ou Positivo, de acordo com os intervalos de valor do índice fornecidos na **Tabela 1**, abaixo.



Resultado	Valor do índice
Negativo	≤ 0,74
Indeterminado	0,75 – 1,1
Positivo	≥ 1,2

MATERIAIS FORNECIDOS COM O PRODUTO FUNGITELL® STAT

O produto Fungitell® STAT destina-se à utilização em diagnóstico *in vitro*. Os seguintes materiais fornecidos com cada produto são suficientes para um total de 10 reações (com base nos 10 frascos de reagente Fungitell® STAT). Cada produto também contém 5 frascos de Fungitell® STAT Standard e, assim, pode suportar até cinco execuções quando 1 frasco de Fungitell® STAT Standard e 1 amostra do paciente são testados por execução. Alternativamente, um único frasco de Fungitell® STAT Standard pode ser executado com até 9 amostras de pacientes.

- Reagente Fungitell® STAT, um LAL específico de (1→3)-β-D-glucano liofilizado (10 frascos). Reagente *Fungitell® STAT está livre de níveis de (1→3)-β-D-glucano interferentes*.
- Fungitell® STAT Standard (5 frascos), com o volume de reconstituição específico do n.º de lote no rótulo.
- Instruções de utilização.
- Guia visual rápido.

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Todos os materiais devem estar livres de glucano interferente. Os objetos de vidro devem ser despirogenados com calor seco durante pelo menos 7 horas, a um mínimo de 235°C (ou a um equivalente validado) para serem considerados adequados para utilização.

- Água de reagente LAL* (frasco de 5,5 mL, catálogo # W0051-10).
- Solução de pré-tratamento alcalino 0,125 M KOH e 0,6 M KCl * (frasco de 2,5 mL, catálogo #APS51-5).
- Pipetas capazes de fornecer volumes de 20-200 µL e 100-1000 µL.
- Pontas de pipeta* (250 µL catálogo # PPT25 e 1000 µL catálogo # PPT10).
- Pontas longas de pipeta* (20-200 µL, catálogo # TPT50).
- Tubos de ensaio* para a preparação de amostra do paciente e combinar a solução de pré-tratamento do soro. (12 x 75 mm, catálogo # TB240-5).
- Leitor de tubo e software de ensaio cinético.
 - Um leitor de tubo de 8 alvéolos da Lab Kinetics automatizado (instrumento PKF08) e software de análise de beta-glucano (BG Analytics™), fornecido por Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) catálogo # PKF08-PKG** **ou**
 - Leitor de tubo de incubação (37°C) capaz de ler a 405 nm e 495 nm com uma gama de pelo menos 0 – 1,0 unidades de absorvência e para acobardar frascos de 12 mm de diâmetro; conjugado com software de ensaio cinético informático apropriado, capaz de observar e analisar a cinética de reação, além de apoiar a revisão dos critérios enumerados na seção de Controle de Qualidade das instruções de utilização (IFU).

8. Tubos de armazenamento esterilizados, sem glucano e de rosca para alíquotas de amostras (a maioria dos tubos que estão certificados como sendo livres de RNase, DNase, e pirogênio estão livres de níveis de (1→3)-β-D-glucano interferentes).

9. Parafilm®

**Estes produtos fornecidos por Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), são certificados como livres de glucanos interferentes.*

***Cópias impressas dos manuais de utilizador do software BG Analytics™ e do instrumento PKF08 podem ser descarregados a partir do site ACC: www.acciusa.com.*

Cuidado - pipetas de vidro com tampões de algodão e pontas de micropipeta com filtros de celulose são potenciais fontes de contaminação com glucano.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto destina-se apenas ao DIAGNÓSTICO IN VITRO.

O ensaio Fungitell® STAT requer atenção rigorosa à técnica e o ambiente de teste. A formação sólida do técnico no método de ensaio e na prevenção da contaminação é crítica para a eficácia do ensaio.

1. Certas espécies de fungos produzem níveis muito baixos de (1→3)-β-D-glucano e não são normalmente detetadas pelo ensaio de Fungitell® STAT. Estas incluem o género *Cryptococcus*^{16,17} e também *Mucorales* como *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus*¹⁷. Além disso, *Blastomyces dermatitidis*, na sua forma de levedura, produz níveis baixos de (1→3)-β-D-glucano e não é por isso normalmente detetado pelo Reagente Fungitell® STAT¹⁸.

2. Não pipete qualquer material com a boca. Não fume, coma ou beba em áreas onde são manuseadas amostras ou reagentes do kit. Siga os regulamentos de segurança locais e da empresa.

3. Crie um ambiente limpo onde realizar o ensaio. Utilize materiais e reagentes que estão certificados como sendo livres de níveis de base de (1→3)-β-D-glucano detetáveis. Tenha em conta que o glucano, além da contaminação fúngica do corpo humano, roupas, recipientes, água e poeiras no ar, pode causar interferências no ensaio Fungitell® STAT. Materiais celulósicos como gaze, lenços de papel e papelão podem contribuir com (1→3)-β-D-glucano para o ambiente em que o ensaio é realizado.

4. Não utilize materiais para lá da respetiva data de validade.

5. Amostras descoloridas ou turvas como as que estão grosseiramente hemolisadas, lipémicas ou que contenham bilirrubina em excesso podem causar interferência ótica com o ensaio. Se essas amostras forem testadas, os resultados do teste devem ser examinados por evidências de interferência ótica/eou padrões cinéticos incomuns.

6. Utilize roupa de proteção adequada e luvas sem pó quando manusear as amostras do paciente.

7. O soro dos doentes submetidos a hemodiálise pode conter niveis elevados de (1→3)-β-D-glucano quando são utilizadas determinadas membranas dialíticas celulósicas^{19,20,38}. A hemodiálise com triacetato de celulose, membrana de polissulfona ou membranas de polimetacrilato de metilo não parecem interferir com o ensaio.

8. Gazes e esponjas cirúrgicas podem atingir níveis elevados de (1→3)-β-D-glucano, que podem contribuir para um resultado positivo transitório para o ensaio de Fungitell®, como observado em pacientes pós-cirúrgicos^{21,22}.

9. Produtos de fracionamento do sangue como imunoglobulina e albuna intravenosas também podem ter cargas de (1→3)-β-D-glucano os quais, se injetados ou infundidos, elevarão a titulação de (1→3)-β-D-glucano durante alguns dias²³.

10. Produtos com conteúdo danificado não devem ser utilizados.

11. Materiais expostos a fluidos potencialmente contaminados (contendo organismos patogénicos) devem ser eliminados de forma consistente com os regulamentos locais.

ARMAZENAMENTO DE REAGENTES

Armazene todos os reagentes, como fornecidos, a 2-8°C no escuro. O Reagente Fungitell® STAT e Fungitell® STAT devem ser utilizados no prazo de 1 hora após a reconstituição.

MANUSEAMENTO DE AMOSTRAS

1. Colheita de Amostras: as amostras de sangue podem ser recolhidas em tubos de preparação de soro esterilizados ou tubos separadores de soro (SST) para a preparação do soro.

2. Armazenamento de Amostras: as amostras de soro podem ser armazenadas temporariamente a 2-8°C antes do ensaio, ou congeladas a -20°C ou mais frio para o armazenamento a longo termo.

3. Rotulagem de Amostras: as amostras devem ser claramente rotuladas de acordo com as práticas aprovadas da instituição.

PROCEDIMENTO

Um Guia Visual Rápido com um resumo do Procedimento automático de instrumento PKF08 e software BG Analytics™ também é incluído na embalagem do produto Fungitell® STAT.

Uma série de passos descritos no Procedimento abaixo são automáticos quando utiliza o instrumento PKF08 e o software BG Analytics™ incluindo: configuração de instrumentos, controlo de qualidade e interpretação de resultados. Consulte o Manual de Utilizador do Software BG Analytics™ ou contacte o fabricante para obter informações adicionais.

Nota:

• Utilize boas práticas de laboratório de acordo com os seus regulamentos locais. Este ensaio é sensível à contaminação e imprecisão de pipetagem.

• Recomenda-se realizar os Passos 3-5 e 7 numa câmara de segurança biológica para aumentar a segurança do operador enquanto trabalha com amostras de pacientes e para reduzir o potencial de contaminação pelo (1→3)-β-D-glucano ambiental durante o procedimento.

• Para reduzir os movimentos desnecessários de frascos de vidro para dentro e fora da câmara de segurança biológica, recomenda-se colocar o dispositivo de vórtice dentro da câmara de segurança biológica (desde que o fluxo de ar crítico seja mantido).

• Recomenda-se utilizar pontas longas de pipeta para ajudar a evitar a contaminação cruzada entre frascos.

• Um Fungitell® STAT Standard (tampa vermelha e rótulo com linha vermelha) deve ser sempre processado nas mesmas condições e ao mesmo tempo que a(s) amostra(s) de pacientes numa execução. Isto é crítico pois o resultado do ensaio é um índice (amostra/padrão) das taxas de reação cinética (ou inclinações, OD/seg) da amostra do paciente e o Fungitell® STAT Standard.

• Recomenda-se utilizar 2 suportes de tubos durante o procedimento, um para os frascos de separação de amostras (Passos 4-6) e um para os frascos de reagente (Passos 7-8). Isto ajudará a evitar o potencial para a mistura de frascos e contaminação cruzada durante o procedimento.

• Recomenda-se colocar o Fungitell® STAT Standard numa posição definida e consistente dentro do suporte de tubos, incubadora e leitor. Quando utilizar o instrumento PKF08 e o software BG Analytics™, utilize o primeiro alvéolo no lado esquerdo, que está rotulado como “Standard”.

• No final de cada passo de mistura, confirme visualmente que a solução é misturada de forma homogênea.

• Não misture demasiado o Reagente Fungitell® STAT. Uma configuração máxima de 2000 RPM é recomendada para qualquer dispositivo de vórtice. Não aplique vórtice por mais de 5 segundos.

1. Configuração de instrumentos

As configurações podem variar com os diferentes instrumentos e software. No geral, devem ser atendidas as seguintes condições: o instrumento deve ser capaz de alcançar e manter uma temperatura de 37°C±1°C. O instrumento e o software devem ser capazes de ler a densidade ótica ao longo do tempo (cinética) em dois comprimentos de onda. Especificamente, estes comprimentos de onda devem ser configurados a 405 nm e 495 nm. Configure o modo cinético para um período de leitura de 40 minutos (2400 segundos). Configure o intervalo de leitura cinética para o mínimo permitido pelo software/ instrumento ao longo do período de 40 minutos do teste e para iniciar a leitura após a inserção da amostra. Verifique o manual do software para determinar como calcular uma medição do índice (inclinação) a partir do conjunto de dados. Para efeitos deste teste, isto é geralmente alcançado pela execução de uma regressão linear nos dados cinéticos ao longo do prazo sugerido. Configure o cálculo de regressão linear para executar no intervalo entre 1900 e 2400 segundos, utilizando a função de “corte” do software. A leitura deve começar sem qualquer desfasamento.

2. Confirme a informação específica do lote de Fungitell® STAT Standard.

- Os volumes de solução de reconstituição e pré-tratamento específico de lote encontram-se no rótulo da embalagem de Fungitell® STAT Standard, no Certificado de Análise do produto Fungitell® STAT, e disponível no site ACC. Esta informação será necessária para completar o Passo 5 abaixo.
- Recomenda-se anotar a informação específica do lote no Guia Visual Rápido fornecido com o produto Fungitell® STAT antes de iniciar o procedimento.

***Nota:** Cada produto (par de Fungitell® STAT Standard e Reagente Fungitell® STAT) é testado e lançado de modo independente. Dessa forma, é importante anotar e utilizar a informação específica do lote para cada par.*

3. Rotular tubos

- Rotule um tubo vazio para cada amostra de paciente a ser testada.
- Rotule um tubo de Reagente Fungitell® STAT para cada amostra de paciente a ser testada.
- Rotule um tubo de Reagente Fungitell® STAT para o Fungitell® STAT Standard.

4. Prepare os tubos de amostra do paciente

- Aplique vórtice nas amostras do paciente durante pelo menos 20 segundos para assegurar a homogeneidade. ***Nota:** o processo de congelação pode produzir a heterogeneidade das amostras devido à captação de água para o cristal de gelo crescente, excluindo assim solutos.*
- Para o tubo vazio devidamente rotulado, adicione a amostra do paciente e a Solução de Pré-tratamento Alcalino numa proporção de 1:4. Os volumes recomendados são de 50 µl de amostra do paciente e 200 µl de Solução de Pré-tratamento Alcalino. ***Nota:** a Solução de Pré-tratamento Alcalino converte glucanos de tripla-hélice e, glucanos de cadeia única^{14,15} que são mais reativos no ensaio. Adicionalmente, o pH alcalino serve para desativar proteases séricas inativas e inibidores que possam interferir com o ensaio²⁴.*
- Aplique vórtice por 15 segundos e tape.

5. Prepare o tubo com Fungitell® STAT Standard

- Reconstitua um frasco de Fungitell® STAT Standard com o volume específico do lote de Água de Reagente LAL e aplique vórtice por 15 segundos.
- Adicione o volume específico do lote de Solução de Pré-tratamento Alcalino. ***Nota:** os volumes de solução de reconstituição e pré-tratamento específico de lote são indicados no rótulo da embalagem de Fungitell® STAT Standard, no Certificado de Análise do produto Fungitell® STAT, e estão disponíveis no site ACC.*
- Aplique vórtice por 15 segundos e tape.

6. Incubação pré-tratamento no leitor de tubos

Faça a incubação dos tubos de amostra do paciente (do Passo 4) e o frasco de Fungitell® STAT Standard (do Passo 5) por 10 minutos, a 37°C.

7. Prepare os tubos de Reagente Fungitell® STAT

- Reconstitua cada um dos frascos de Reagente Fungitell® STAT (rotulado no Passo 3, acima) com 300 µl de Água de Reagente LAL.
- Aplique vórtice suavemente por **não mais** de 5 segundos. ***Nota:** o Reagente Fungitell® STAT contém uma série de proteínas ativas necessárias para o ensaio e recomenda-se manusear a solução com cuidado. Uma configuração máxima de 2000 RPM é recomendada para qualquer dispositivo de vórtice. Não misture demasiado.*
- No final do tratamento de pré-incubação:
 - Transfira 75 µl de cada solução de amostra de paciente no seu tubo de Reagente Fungitell® STAT correspondente.
 - Transfira 75 µl de Fungitell® STAT Standard no seu tubo de Reagente Fungitell® STAT correspondente.
 - Aplique vórtice em todos os tubos para **não mais** de 5 segundos e tape.

8. Inicie a execução

- Insira os tubos no leitor de tubo enquanto confirma que cada um está no alvéolo previsto.
- Inicie a leitura cinética por um período de 40 minutos, a 37°C.

9. Reveja os critérios do Controle de Qualidade

*Consulte a seção de Controle de Qualidade abaixo e a **Figura 2**.*

10. Interpretação de Resultados

*Consulte a seção de Interpretação de Resultados abaixo e a **Figura 3**.*

ELIMINAÇÃO DE FRASCOS NO FINAL DO PROCEDIMENTO

• Recomenda-se eliminar os frascos de Solução de Pré-tratamento Alcalino e Água de Reagente LAL abertos, em conformidade com os seus procedimentos laboratoriais. Não utilize estes materiais para mais de uma execução, para evitar a potencial contaminação.

• Como parte do fabrico do produto, o Reagente Fungitell® STAT e o Fungitell® STAT Standard são lançados como lote emparelhado e, devido a isto, os componentes do Reagente Fungitell® STAT e de Fungitell® STAT Standard de diferentes lotes de produção não devem ser utilizados. Desse modo, quando todos os frascos de Reagente Fungitell® STAT numa embalagem forem utilizados, recomenda-se eliminar os restantes frascos, caso existam, de Fungitell® STAT Standard.

CONTROLO DE QUALIDADE

• **Para todos os números de alvéolos**, confirme o n.º de atribuição de Fungitell® STAT Standard ou Amostra

• **Para o resultado de Fungitell® STAT Standard**

- o coeficiente de correlação (r) deve ser ≥ 0,980 e
- a inclinação deve estar dentro do intervalo de inclinação esperado de 0,00010 – 0,00024 OD/segundo. *Se o resultado de Fungitell® STAT Standard não cumprir os critérios n.º1 e n.º2, a execução é inválida e todas as amostras devem ser realizadas novamente.*

• **Para todos os resultados de amostras do paciente**

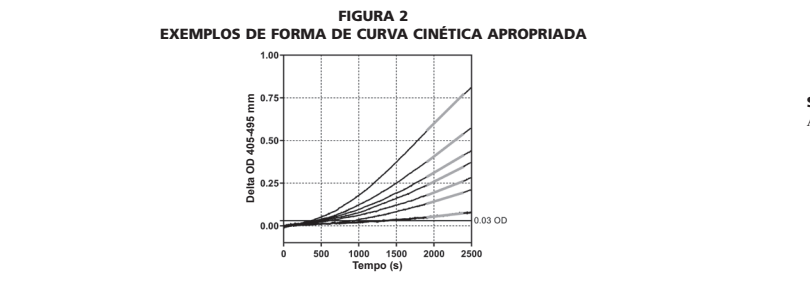
- A. Determine se o resultado estiver fora do intervalo do índice do ensaio**
- O resultado está provavelmente fora do intervalo no lado positivo se:
 - A intercetação em Y é positiva e
 - A curva cinética passa os 0,4 OD antes de 1000 segundos.
 - O resultado está provavelmente fora do intervalo no lado negativo se:
 - A curva cinética é positiva após 500 segundos e
 - Tem um OD >0,03 e <0,07 no final do teste.

*Se o resultado da Amostra satisfaz ambos os critérios para fora do intervalo positivo ou negativo, os critérios do CQ geral abaixo não precisam ser preenchidos, e o valor de índice **não** deve ser calculado. Todos os resultados fora do intervalo no lado positivo devem ser indicados como "Positivos" e todos os resultados fora do intervalo no lado negativo devem ser indicados como "Negativos".*

B. Se o resultado não satisfaz os critérios fora do intervalo, verifique o CQ geral:

- a curva cinética deve ser positiva após 500 segundos,
- a curva cinética deve ter um OD ≥ 0,03 no final do teste,
- a inclinação deve ser numericamente positiva,
- o coeficiente de correlação (r) deve ser ≥ 0,980 e
- a curva cinética deve ter uma forma curva crescente ascendente, consistente com os exemplos apresentados na **Figura 2**.

*Se o resultado da Amostra não cumprir **todos** os critérios 1-5 do CQ geral, o resultado da amostra é inválido e a amostra tem que ser testado novamente. Alternativamente, deve ser utilizado um método diferente.*



Amostras de controlo (negativa, perto dos limiares do ensaio, ou a níveis altamente positivos) podem ser executadas para verificar que os reagentes e os ensaios estão a funcionar devidamente. Cada utilizador do teste deve estabelecer um programa de controlo de qualidade para assegurar a competência no desempenho do teste, em conformidade com os regulamentos aplicáveis à sua localização.

INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Os resultados do teste de Fungitell® STAT devem ser utilizados como ajuda no diagnóstico da infeção fúngica invasiva. Os índices de amostra do paciente e de Fungitell® STAT Standard são derivados do cálculo da inclinação (índice) entre os 1900 e 2400 a partir dos resultados de OD 405 - 495 nm. Os resultados do índice de Fungitell® STAT são derivados da divisão do índice (inclinação) da amostra do paciente pelo índice (inclinação) do Fungitell® STAT Standard (*consulte a Figura 3*). Os resultados do índice variam de aproximadamente 0,4 a 3,5, cobrindo a curva completa de Standard (31 – 500 pg/mL) do predicado Fungitell®. Os valores de índice de Fungitell® STAT devem ser interpretados como descrito abaixo:

RESULTADO NEGATIVO

Valores de índice ≤ 0,74 são interpretados como resultados negativos.

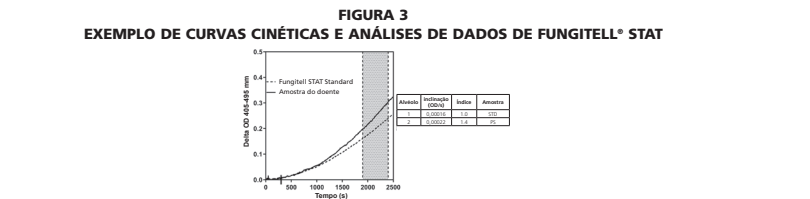
RESULTADO INDETERMINADO

Valores de índice de 0,75 a 1,1 sugerem uma possível infeção fúngica. Recomendam-se a amostragem e testes adicionais de soros. Amostragem e testes frequentes melhoram a utilidade para diagnóstico.

RESULTADO POSITIVO

Valores de índice ≥ 1,2 são interpretados como resultado positivo. Um resultado positivo significa que foi detetado (1→3)-β-D-glucano. Um resultado positivo não define a presença da doença e deve ser utilizado em conjunto com outras manifestações clínicas para estabelecer um diagnóstico.

O laboratório que realiza o teste deve informar o médico requerente que nem todas as infeções fúngicas resultam em níveis elevados de (1→3)-β-D-glucano sérico. Alguns fungos, como o género *Cryptococcus*^{16,17} produzem níveis muito baixos de (1→3)-β-D-glucano. *Mucorales*, como *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus*¹⁷ não são conhecidos por produzir (1→3)-β-D-glucano. Do mesmo modo, *Blastomyces dermatitidis*, na sua fase de levedura, produz um pouco de (1→3)-β-D-glucano, e os pacientes com blastomicose têm níveis indetetáveis de (1→3)-β-D-glucano no ensaio de Fungitell® STAT¹⁸.



A região destacada a cinzento é a área de determinação da inclinação (1900 a 2400 segundos (s)), a linha sólida é um exemplo de Amostra de Paciente (PS) e a linha tracejada é a Fungitell® STAT Standard (STD). A inclinação da amostra (ou seja, 0,00022 OD/s) dividido pela inclinação de 80 pg/mL do Fungitell® STAT Standard (ou seja, 0,00016 OD/s) conduz a um índice de 1,4 para a amostra. A inclinação e o índice são sinónimos nesta aplicação.

LIMITAÇÕES DO TESTE

1. As localizações dos tecidos de infeção fúngica¹⁹, encapsulamento, e a quantidade de (1→3)-β-D-glucano produzido por certos fungos e afetam a concentração sérica desta substância a analisar. A capacidade reduzida de contribuir com (1→3)-β-D-glucano para a corrente sanguínea pode reduzir a capacidade de detetar certas infeções fúngicas. *Cryptococcus spp.* produz níveis baixos de (1→3)-β-D-glucano^{16,17}. *Mucorales*, incluindo*Absidia spp.*, *Mucor spp.* e *Rhizopus spp.* não são conhecidos como produzindo (1→3)-β-D-glucano¹⁷*Blastomyces dermatitidis*, na sua fase de levedura, produz um pouco de (1→3)-β-D-glucano, e os resultados de teste são normalmente negativos¹⁸. Esta informação deve ser fornecida ao médico que a solicita.

2. Alguns indivíduos têm valores de índice de (1→3)-β-D-glucano que caem na zona indeterminada. Nestes casos, são recomendados testes de vigilância adicionais.

3. A frequência de testes do paciente dependerão do risco relativo de infeção fúngica. Recomendam-se taxas de amostragem de pelo menos duas a três vezes por semana para pacientes em risco.

4. Podem encontrar-se resultados positivos em pacientes submetidos a hemodiálise^{19,20}, indivíduos tratados com certos produtos de fracionamento de sangue, tal como a albumina sérica e as imunoglobulinas e, em amostras ou indivíduos expostos a gaze e esponjas cirúrgicas que contêm glucano. Os pacientes precisam de 3 – 4 dias para a restauração dos níveis de base do (1→3)-β-D-glucano sérico, depois da exposição cirúrgica a esponjas e gaze que contenham (1→3)-β-D-glucano^{21,22}. Deste modo, deve ter-se em conta o calendário da amostragem de pacientes cirúrgicos.

5. Amostras obtidas pelos métodos de punção no calcanhar ou no dedo são inaceitáveis, dado que foi demonstrado que a gaze embebida em álcool utilizada para preparar o local (e, potencialmente, a convergência do sangue à superfície da pele) contamina as amostras. Em estudos realizados até o momento, não foram observadas diferenças entre amostras obtidas pelos desenhos de linhas ou venopunção^{23,24}.

6. Foram estabelecidos níveis de teste em indivíduos adultos. Os níveis normais e de limiar em crianças e pediátricos estão sob investigação^{27,28}.

SUBSTÂNCIAS DE INTERFERÊNCIA

As seguintes condições de amostra podem interferir com um resultado de ensaio de Fungitell® STAT preciso:

- Hemólise
- Turvação da amostra causada por lipemia
- A presença de bilirrubina detetada visualmente
- Soro turvo
- Níveis elevados de Imunoglobulina G, como os que podem existir no soro devido a múltiplos melanomas, podem resultar em precipitação na mistura de reação, após a adição de Fungitell® STAT ao soro previamente tratado²⁹.

VALORES ESPERADOS

Um estudo prospetivo multicêntrico realizado para determinar as características de desempenho do ensaio de Fungitell (predicado) descobriu que os valores de β-glucano são elevados numa variedade de infeções fúngicas. Quando sinais e sintomas estão presentes nos nível de 80 pg/mL ou superior, o valor previsto a que o indivíduo é positivo para uma infeção fúngica varia de 74,4 a 91,7%. Na ausência de sinais e sintomas a menos de 60 pg/mL, os valores negativos previstos variaram de 65,1% a 85,1%.

Os valores de índice de β-glucano de Fungitell® STAT ≥ 1,2 são interpretados como um resultado positivo alinhado com o limiar de 80 pg/mL do produto predicado Fungitell® enquanto os valores de índice ≤ 0,74 são interpretados como resultados negativos alinhados com o limiar de 60 pg/mL do produto predicado Fungitell®.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

TESTE DE COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

Amostras de soro do paciente congeladas e com identificação removida, recolhidas para o tratamento clínico de rotina da população-alvo e recebidas no Beacon Diagnostics® Laboratory, Inc para testes do predicado Fungitell® foram utilizadas para efeitos do estudo de comparação de métodos. Beacon Diagnostics® Laboratory, Inc é a parte de laboratório licenciado de Gestão da Qualidade no Laboratório Clínico (CLIA) da ACC. Uma população de 488 amostras de soro de paciente com identificação removida foi incluída no estudo com concentrações de (1→3)-β-D-Glucano distribuídas ao longo de todo o intervalo da curva padrão de predicado Fungitell®. Estas incluem 309 amostras que caíram na zona Negativa dos resultados do teste de predicado Fungitell®, 143 amostras que caíram na zona Positiva do predicado Fungitell®, e 36 amostras que caíram na zona Indeterminada do predicado Fungitell® (**Tabela 2**). Todas as amostras foram testadas com ensaios de Fungitell® STAT e Fungitell® durante este estudo. Quando as amostras que caem na zona Indeterminada do Fungitell® STAT foram excluídas da análise, houve 290 amostras restantes para análise de concordância de percentagem negativa e 119 amostras restantes para análise de concordância de percentagem positiva

		TABELA 2 DESEMPENHO DE FUNGITELL® STAT COMPARADO COM FUNGITELL®			
		Predicado Fungitell®			Total
Fungitell® STAT	Negativa	283	17	1	301 (61,7%)
	Indeterminada	19	17	24	60 (12,3%)
Positivo	7	2	118	127 (26,0%)	
Total	309 (63,3%)	36 (7,4%)	143 (29,3%)	488 (100%)	
	NPA: 97,6%* (283/290) 95% CI: (95,4; 99,9)		PPA: 99,2%* (118/119) 95% CI: (95,4; 99,9)		

**Resultados indeterminados (ou seja, equívocos) não incluídos na análise; se todos os resultados indeterminados forem considerados resultados discordantes (por ex. falsos positivos ou falsos negativos), o desempenho é o seguinte: PPA - 73,8% (118/160), 95% CI: (66,4%; 80,0%); NPA - 91,0% (283/311), 95% CI: (87,3%; 93,7%)*

CONCORDÂNCIA DE PERCENTAGEM NEGATIVA

Duzentos e oitenta e três (283) das 290 amostras que eram negativas quando testadas com o dispositivo Fungitell® adotado também eram negativas com o ensaio de Fungitell® STAT. A concordância de percentagem negativa (NPA) calculada com o método adotado de Fungitell® era de 97,6% (Intervalo de Confiança a 95%: 95,4%; 99,9%) (**Tabela 2**).

CONCORDÂNCIA DE PERCENTAGEM POSITIVA

Cento e dezoito (118) das 119 amostras que eram positivas quando testadas com o dispositivo Fungitell® adotado também eram positivas com o ensaio de Fungitell® STAT. A concordância de percentagem positiva (PPA) calculada com o método adotado de Fungitell® era de 99,2% (Intervalo de Confiança a 95%: 95,4%; 99,9%) (**Tabela 2**).

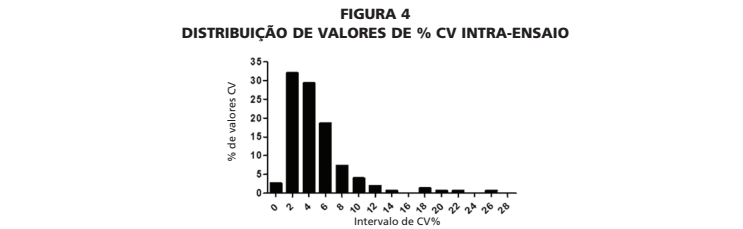
ESTUDO DE REPRODUTIBILIDADE

O Fungitell® STAT foi avaliado em termos de reprodutibilidade, acrescentando soro humano com Saccharomyces cerevisiae (1→3)-β-D-Glucano para produzir um painel de cinco membros, que consiste numa amostra negativa baixa, amostra negativa alta (logo abaixo do limiar inferior de 0.74), amostra indeterminada (equivoca), amostra positiva baixa (logo acima do limiar superior de 1,2) e amostra positiva alta (~2x acima do limiar superior de 1,2). O painel foi distribuído a três laboratórios CLIA para testar com o ensaio de Fungitell® STAT. Cada laboratório forneceu 150 pontos de dados (ou seja, 5 amostras x triplicar por execução x dois operadores a realizar uma execução por dia x 5 dias) para um total de 450 pontos de dados. Os valores médios do Índice do estudo apresentados na **Tabela** abaixo são derivados dos dados fornecidos pelos três laboratórios. A coluna de Percentagem Positiva representa a percentagem de amostras para determinado membro do painel que caem na zona Positiva. Entre todos os três laboratórios, os resultados de Percentagem Positiva foram de 1,1% para a amostra Negativa Baixa, 0% para a amostra Negativa Alta, 3,3% para a amostra Indeterminada, 96,7% para a amostra Positiva Baixa e 100% para as amostras Positivas Altas.

Membro do painel	Índice médio	Desvio-padrão	% CV	Percentagem positiva (Número de pos./Número testado)
Negativo baixo	0,55	0,10	20,4%	1,1% (1/90)
Negativo alto	0,75	0,08	11,1%	0% (0/90)
Indeterminado	0,94	0,10	11,1%	3,3% (3/90)
Positivo baixo	1,6	0,30	18,7%	96,7% (87/90)
Positivo alto	2,6	0,40	15,4%	100% (90/90)

PRECISÃO

A variação intra-ensaio (ou seja %CV) variou de 0,4% a 26,8% e os valores intra-ensaio variaram de 11 a 20,4%. Com relação à área de variação intra-ensaio, a distribuição do intervalo de % CV é apresentada abaixo na **Figura 4**. No geral, 94% dos valores de CV foram 10% ou menos e 75% dos valores de CV foram 6% ou menos.



META-ANÁLISES

Além disso, foram publicados inúmeros estudos avaliados por pares sobre o tema do suporte de soro baseado em (1→3)-β-D-glucano para o diagnóstico de doenças fúngicas invasivas, incluindo a meta-análise de desempenho do diagnóstico^{20,31,32,33,34,35,36,37}.

LEGENDA DE SÍMBOLOS

	“Utilização por”		“Limitação de temperatura”
	“Contém suficiente para testes ‘N’”		“Fabricante”
	“Código do lote”		“Consulte as instruções de utilização”
	“Dispositivo médico de diagnóstico in vitro”		“Representante autorizado”
	“Catálogo n.º”		“Marca CE

only “Para utilização apenas com prescrição”

	ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED	Telephone: (508) 540-3444
	124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02556 USA	Número gratuito: (888) 395-2221
		Fax: (508) 540-8680
		Assistência técnica: (800) 848-3248
	Serviço de apoio ao cliente: (800) 525-8378	

EC REP Associates of Cape Cod Europe GmbH, Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Alemanha
Representante no Reino Unido: Associates of Cape Cod, Int'l, Inc, Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Reino Unido

Promotor australiano: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Austrália

Referências

- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., e Ostrosky-Zeichner, L. 2004. β-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199-205.
- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., e Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.
- Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., e Hashimoto, Y. 1991. Activation of a Limulus coagulation factor G by (1→3)-β-D-Glucans. Carbohydrate Res. 218:167-174.
- Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., e Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-β-D-Glucans in the activation of coagulation factor G from Limulus ameocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.
- Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., e Saito, H. 1993. Activation of Limulus coagulation factor G by several (1→3)-β-D-Glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.
- Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K-I., Ishikawa, N., e Hara, K. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. J. Clinical Microbiol. 33: 3115-3118.
- Binder, U., Maurer, E., e Lass-Flörl, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Lin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl.6): 60-66.
- Girouard, G., Lachance, C., e Pelletier, R. 2007. Observations of (1→3)-β-D-Glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. J. Med. Mycology 56: 1001-1002.
- Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., e Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. Kidney International 60: 319-323.
- Kato, A., Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., e Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-β-D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
- Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y., e Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauze types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.
- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., e Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
- Held J, Wagner D.β-d-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in Pneumocystis jirovecii pneumonia. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1118-22.
- Ogawa, M., Hori, H., Niiguchi, S., Azuma, E., e Komada, Y. 2004. False positive plasma (1→3)-β-D-Glucan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. Int. J. Hematol. 80: 97-98.
- Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I., e Mayer, J. Difficulties in using 1,3-[beta]-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies–high frequency of false-positive results and their analysis. J. Med. Microbiol. 2010; 59:1016-22.
- Posteraro B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi,M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguinetti, M., e Antonelli, M. 2011 Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)-β-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. Crit Care 15: R249.
- Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., e Steinbach, W.J. 2007. (1→3)-β-D-Glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-glucan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924-925.
- Goudjil, S., Kongolo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Cornu, M., Leke, A., e Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. J. of Maternal-Fetal and Neonatal Med. 26: 44-48.
- Issa, N.C., Koo, S., Lynch, R.C., Gay, C., Hammond, S.P., Baden, L.R., Ghorbrial, I.M., Finkelman, M.A., e Marty, F.M... 2012 Serum galactomannan and (1->3)-β-D-glucan assays for patients with multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia. J.Clin. Microbiol. 50:1054-6.
- Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 52:750-70.
- Hou TY, Wang SH, Liang SX, Jiang WX, Luo DD, Huang DH. The Screening Performance of Serum 1,3-Beta-D-Glucan in Patients with Invasive Fungal Diseases: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. PLoS One. 2015 Jul 6;10:e0131602.
- Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. β-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633-43.
- Onishi AI, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012; 50:7-15.
- Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39-49.
- He S1, Hang JP2, Zhang L2, Wang F2, Zhang DC3, Gong FH4 A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-β-d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect; 2015 Aug;48:351-61.
- Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39-49.
- He S1, Hang JP2, Zhang L2, Wang F2, Zhang DC3, Gong FH4 A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-β-d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect; 2015 Aug;48:351-61.
- Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? The Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role of (1→3)-β-D Glucan. PLoS One. 2016 Oct 20;11(10):e0164978. doi: 10.1371/journal.pone.0164978. eCollection 2016.