

## Saggio per il rilevamento del (1→3)-β-D-glucano nel siero



Per ottenere le istruzioni per l'uso in una lingua diversa, visitare il sito [www.acciusa.com](http://www.acciusa.com).

*Questo prodotto è esclusivamente per uso diagnostico in vitro e per uso professionale.*

**1. Uso previsto**
Fungitell STAT® è un saggio colorimetrico a base di zimogeno della proteasi formulato per la determinazione qualitativa del (1→3)-β-D-glucano nel siero di pazienti con sintomi di micosi invasive o condizioni mediche che li predispongano a tali infezioni. La concentrazione sierica del (1→3)-β-D-glucano, un importante componente della parete cellulare di vari miceti di rilievo dal punto di vista medico¹, può essere usata come ausilio nella diagnosi delle micosi e delle fungemie radicate². Un risultato positivo non indica il genere di miceti responsabile dell'infezione.

I valori di indice del (1→3)-β-D-glucano devono essere usati contestualmente ad altre procedure diagnostiche quali colture microbiologiche, esame istologico di campioni bioptici ed esami radiologici.

**2. Sommario e spiegazione**
L'incidenza delle micosi causate da agenti patogeni opportunisti è in aumento, in particolare tra i pazienti immunocompromessi³,⁴,⁵. Le micosi invasive, in qualità di infezioni opportunistiche, sono frequenti tra i pazienti affetti da neoplasie ematologiche maligne e da AIDS e sono responsabili di un numero sempre maggiore di infezioni nosocomiali, in particolare tra i soggetti sottoposti a trapianto di organi e altri pazienti in terapia immunosoppressiva⁶,7 Molte patologie micotiche vengono acquisite tramite inalazione di spore fungine provenienti da suolo, detriti vegetali, impianti di climatizzazione e/o superfici esposte. Alcuni miceti opportunisti sono presenti nella o sulla cute umana, nel tratto intestinale e nelle mucose⁸,⁹. La diagnosi delle micosi invasive e delle fungemie si basa generalmente su tecniche diagnostiche o radiologiche di natura non specifica. Di recente, ai metodi diagnostici disponibili si sono aggiunti dei marcatori biologici di micosi².

I patogeni micotici opportunisti includono Candida spp., Aspergillus spp., Fusarium spp., Trichosporon spp., Saccharomyces cerevisiae, Acremonium spp., Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Sporothrix schenckii, Exserohilum rostratum e Pneumocystis jirovecii. Il (1→3)-β-D-glucano prodotto da questi e da altri organismi è rilevabile mediante il saggio Fungitell STAT®<sup>1,5,10,11</sup>.

**3. Principio della procedura**
Fungitell STAT® (n. cat. FT007, Associates of Cape Cod, Inc.) nasce da una modifica progettuale al formato del saggio Fungitell® (n. cat. FT001, Associates of Cape Cod, Inc. o ACC). Fungitell STAT® (dispositivo a marchio CE 2019) è stato sviluppato per rispondere all'esigenza di un test monouso di dimensioni ridotte rispetto al formato per piastra a 96 pozzetti del saggio Fungitell® (dispositivo a marchio CE 2008 e legalmente commercializzato negli Stati Uniti d'America).

Fungitell STAT® permette di effettuare una misurazione qualitativa del (1→3)-β-D-glucano ed è un saggio basato su una modifica del meccanismo a cascata del lisato di amebociti di *Limulus* (LAL)<sup>12,13,14,15</sup>, **Figura 1**. Il reagente Fungitell STAT® è stato modificato in modo da eliminare la reattività alle endotossine batteriche e da reagire, quindi, esclusivamente con il (1→3)-β-D-glucano, tramite la tappa del meccanismo a cascata mediata dal fattore G. Il (1→3)-β-D-glucano attiva il fattore G, uno zimogeno della serin proteasi. Il fattore G attivato converte l'enzima procoagulante inattivo in enzima coagulante attivo, che a sua volta scinde la para-nitroanilide Boc-Leu-Gly-Arg-pNA liberando un cromoforo, la para-nitroanilina (pNA), che assorbe a 405 nm. Il saggio cinetico Fungitell STAT® descritto di seguito si basa sulla determinazione del tasso di variazione dell'aumento di densità ottica prodotto da un campione di siero del paziente. Questo tasso di variazione viene messo a confronto con quello dello standard Fungitell STAT® (reagente a concentrazione nota) allo scopo di generare un indice. Lo standard Fungitell STAT® è calibrato a una concentrazione di 80 ± 8 pg/ml, che rappresenta il cutoff positivo per il saggio Fungitell®. Questo valore di indice del campione di siero del paziente viene interpretato, dal punto di vista qualitativo, come risultato negativo, indeterminato o positivo in base all'intervallo di valori di indice presentato nella **Tabella 1** qui sotto.

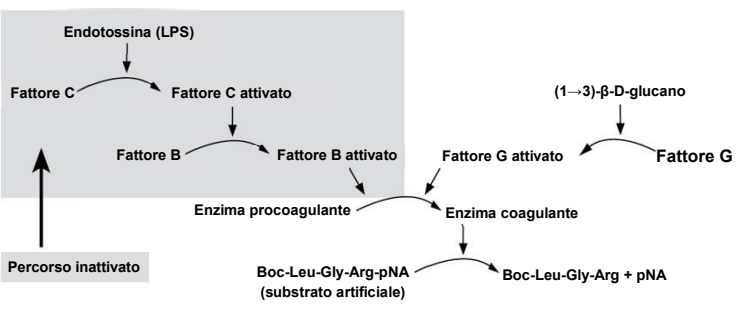


Figura 1. Meccanismo a cascata del lisato di amebociti di Limulus

Tabel 1. Intervalli di indice per Fungitell STAT®	
Risultato	Valore dell'indice
Negativo	≤ 0,74
Indeterminati	0,75-1,1
Positivo	≥ 1,2

**4. Materiali forniti in dotazione con il prodotto Fungitell STAT®**
Fungitell STAT® è un prodotto per uso diagnostico.

I seguenti materiali forniti in dotazione con ciascun prodotto sono sufficienti per un totale di 10 reazioni (basate sulle 10 provette di reagente Fungitell STAT®). Ciascun prodotto contiene anche 5 provette di standard Fungitell STAT®.

- Reagente Fungitell STAT®, LAL liofilizzato specifico per il (1→3)-β-D-glucano (10 provette)

*Fungitell Il reagente Fungitell STAT® è costituito dal lisato di amebociti di Limulus (ossia, Limulus polyphemus), dal substrato colorimetrico Boc-Leu-Gly-Arg-pNA e da un tampone Tris. Non contiene proteine umane o di mammifero. Il reagente Fungitelll STAT® non presenta livelli interferenti di (1→3)-β-D-glucano.*
- Standard glucano Fungitell STAT® (5 provette) (1→3)-β-D-glucano liofilizzato.

*Lo standard glucano Fungitelll STAT® è costituito da D-lattosio e (1→3)-β-D-glucano derivati dall'estratto di lievito Saccharomyces cerevisiae.*

*Controllo interno: la concentrazione di (1→3) β-D-glucano nello standard Fungitelll STAT® è calibrata sul valore del limite positivo del prodotto Fungitell (dispositivo a marchio CE 2008 e legalmente commercializzato negli Stati Uniti d'America) e rispetto a uno standard di riferimento interno. Lo standard Fungitelll STAT® contiene una quantità nota di glucano. I valori risultanti sono descritti nella sezione Controllo qualità e fungono da controllo interno per il saggio Fungitelll STAT®.*
- Istruzioni per l'uso
- Guida visiva rapida

**5. Materiali necessari ma non forniti**
Per evitare interferenza, tutti i materiali devono essere privi di glucano.

- Acqua per reagente LAL\* (fiala da 5,5 ml, n. di catalogo W0051-10)
- Soluzione alcalina pre-trattamento KOH 0,125 M e KCl 0,6 M\* (fiala da 2,5 ml, n. di catalogo APS51-5)
- Pipette con volumi di erogazione di 20 - 200 µL e 100 - 1000 µL
- Puntali per pipetta\* (250 µL, n. di catalogo PPT25; 1000 µL, n. di catalogo PPT10)
- Puntali per pipetta lunghi\* (20 - 200 µL, n. di catalogo TPT50)
- Provette\* per la preparazione del campione del paziente e successiva miscelazione con la soluzione di pretrattamento del siero (12 x 75 mm, n. di catalogo TB240-5)
- Lettoe per provette e software per il saggio cinetico
  - PKF08 Lettore di provette in incubazione a 8 pozzetti (PKF08-1, Lab Kinetics, LLC)\*\* con il software Beta Glucan Analytics (BG Analytics®), manuale del software BG Analytics® e protocollo di verifica del sistema BG Analytics\*\*\* (BGA007, Associates of Cape Cod, Inc.). Il dispositivo PKF08 e il software BG Analytics® sono forniti da Associates of Cape Cod, Inc. (n. di catalogo PKF08-PKG\*\*). PKF08-PKG è stato convalidato per l'uso con il saggio Fungitell STAT®. **Oppure...**
  - Lettore di provette in incubazione (37 °C) in grado di effettuare letture a 405 nm e 495 nm con un intervallo di almeno 0 - 1,0 unità di assorbanza, associato a un software per saggi cinetici computerizzati in grado di analizzare la cinetica di reazione e di consentire la valutazione dei criteri elencati nella sezione Controllo qualità delle Istruzioni per l'uso.
- Provette sterili, senza glucano, per il frazionamento dei campioni. È possibile utilizzare provette che siano certificate per l'assenza di RNAsi, DNAsi e pirogenicità.
- Parafilm®

*\*Questi prodotti forniti da Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) sono certificati per l'assenza di glucani interferenti.
\*\*I manuali d'uso sono scaricabili dal sito Web di ACC: [www.acciusa.com](http://www.acciusa.com).*

- Conservazione dei reagenti**
  - Conservare tutti i kit, nelle condizioni in cui sono forniti, in ambiente buio a 2-8 °C.
  - Il reagente Fungitell STAT® e lo standard Fungitelll STAT® sono progettati per essere utilizzati fino a 1 ora dopo la ricostituzione.
- ⚠ **Avvertenze e precauzioni**
  - Non pipettare alcun materiale con la bocca. Non fumare né consumare cibi o bevande nelle aree destinate al trattamento dei campioni o dei reagenti del kit.
  - Attenersi ai regolamenti in materia di sicurezza vigenti a livello locale e adottati dal laboratorio.
  - Indossare guanti protettivi durante la manipolazione dei campioni biologici che potrebbero essere pericolosi o infettivi. Le mani guantate devono essere considerate sempre contaminate; tenerle lontano da occhi, bocca e naso. Indossare occhiali protettivi e mascherina chirurgica se esiste una possibilità di contaminazione da aerosol.
  - I prodotti contenenti componenti danneggiati non devono essere usati.
  - Smaltimento: i residui chimici e dei preparati sono generalmente considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questa tipologia di rifiuti è normato dalle leggi e dai regolamenti nazionali e regionali. Per informazioni sullo smaltimento dei rifiuti pericolosi, contattare le autorità locali o le società che si occupano della gestione dei rifiuti.
  - Le schede dati di sicurezza** del reagente Fungitell STAT®, dello standard Fungitell STAT®, dell'acqua per reagente LAL e della soluzione alcalina pre-trattamento sono scaricabili dal sito Web di ACC: [www.acciusa.com](http://www.acciusa.com).

#### 7.1 Precauzioni procedurali

L'esecuzione del saggio Fungitell STAT® prevede una rigorosa attenzione alla tecnica utilizzata e all'ambiente di analisi. Un accurato addestramento del tecnico alla metodologia di esecuzione del saggio e alla prevenzione della contaminazione è essenziale ai fini dell'efficacia del saggio.

- Predisporre un ambiente pulito in cui eseguire il saggio.
- Tenere presente che sia la contaminazione da glucani sia la contaminazione da particelle fungine derivanti da corpo umano, indumenti, contenitori, acqua e polveri presenti nell'aria possono interferire con il saggio Fungitell STAT®.
- Tra le possibili fonti di contaminazione sono inclusi i materiali contenenti cellulosa come le garze, le salviette di carta e le scatole di cartone, le pipette di vetro con tappi in cotone e i puntali per pipetta con filtri in cellulosa. Anche le medicazioni in garza chirurgica e le spugne possono secernere grosse quantità di (1→3)-β-D-glucano<sup>21,22</sup>. Per informazioni sulle altre fonti di contaminazione correlate al paziente, consultare la sezione Limitazioni del saggio.
- Utilizzare immediatamente le fiale aperte con soluzione alcalina pre-trattamento e acqua per agente LAL; non riutilizzare questi materiali in caso di rischio di contaminazione.
- Il reagente Fungitell STAT® e lo standard Fungitelll STAT® sono disponibili in un unico lotto. Per questo motivo, non è possibile utilizzare alcun componente del reagente Fungitelll STAT® e dello standard Fungitelll STAT® proveniente da altri lotti. Si consiglia, pertanto, di smaltire eventuali residui di standard Fungitelll STAT® subito dopo aver utilizzato tutte le provette di reagente Fungitell STAT® presenti in una confezione.
- Non usare i materiali dopo la data di scadenza indicata.

#### 7.2 Trattamento dei campioni

- prelievo del sangue e la preparazione del siero devono essere effettuati conformemente ai regolamenti locali applicabili. Raccolta dei campioni: per la preparazione del siero, i campioni ematici possono essere prelevati in provette sterili per la preparazione del siero o in provette sterili per la separazione del siero.
- Conservazione dei campioni: i campioni di siero possono essere conservati a 2-8 °C fino a 15 giorni oppure congelati a -20 °C fino a 27 giorni o a -80 °C fino a 4 anni.
- Eticheatura dei campioni: i campioni devono essere etichettati in modo chiaro in base alla prassi approvata dell'istituto medico (laboratorio).

#### 7.3 Note sull'analisi:

- Utilizzare la buona prassi di laboratorio in base ai regolamenti locali in vigore. Questo saggio è sensibile alla contaminazione e alla scarsa accuratezza di pipettaggio.
- Per garantire la sicurezza dell'operatore che utilizza i campioni di siero e ridurre il rischio di contaminazione da (1→3)-β-D-glucano presente nell'ambiente durante la procedura, si consiglia di lavorare in cabina di sicurezza biologica.
- Per ridurre allo stretto necessario gli spostamenti delle fiale di vetro dall'interno all'esterno della cabina di sicurezza biologica e viceversa, si consiglia di tenere il vortex al suo interno (mantenendo il flusso d'aria appropriato).
- Per contribuire ad evitare la contaminazione crociata tra fiale, è consigliabile utilizzare puntali per pipetta lunghi.
- La provetta dello standard Fungitell STAT® (tappo rosso ed etichetta con striscia rossa) deve essere processata sempre nelle stesse condizioni e contemporaneamente ai campioni dei pazienti nell'ambito di una sessione analitica. Ciò è fondamentale in quanto il saggio genera un indice (campione/standard) dei tassi della reazione cinetica (o pendenze, DO/s) provenienti dal campione del paziente e dallo standard Fungitelll STAT®.
- Per evitare confusione e contaminazione crociata, durante la procedura è consigliabile utilizzare rastrelliere di provette separate, una per le provette di preparazione dei campioni e una per le provette di reagente.
- Quando si colloca lo standard Fungitell STAT® all'interno della rastrelliera, dell'incubatore e del lettore, è consigliabile scegliere una posizione e mantenerla invariata. Nel lettore PKF08, utilizzare il primo pozzetto a sinistra contrassegnato dall'etichetta "Standard".
- Al termine di ogni passaggio della miscelazione, osservare la soluzione per verificare che sia stata miscelata in maniera omogenea.

**8. Procedura**
Il prodotto Fungitell STAT® è corredato da una guida visiva rapida contenente illustrazioni e un riepilogo delle caratteristiche dello strumento PKF08 e del software BG Analytics®.

Quando si utilizza il dispositivo PKF08 insieme al software BG Analytics®, sono già preimpostate le seguenti procedure: impostazione del dispositivo, valutazione dei risultati e controllo qualità. Per ulteriori informazioni, consultare il manuale d'uso del software BG Analytics® o contattare il produttore.

**8.1 Impostazione dello strumento e programmazione del saggio**
8.1.1 [Quando si utilizza PKF08 con il software BG Analytics®.](#)
Tænd Accendere il dispositivo e seguire le istruzioni del software BG Analytics®. Per informazioni dettagliate, consultare il manuale BG Analytics®.

8.1.2 [8.1.2 Quando si utilizza un altro strumento con un altro software,](#) è necessario che siano soddisfatte le seguenti condizioni:

- Lo strumento deve poter raggiungere e mantenere una temperatura di 37 °C ± 1 °C.
- Lo strumento e il software devono poter leggere la densità ottica nel tempo (modalità cinetica) a due lunghezze d'onda. Nello specifico, queste lunghezze d'onda devono essere impostate su 405 nm e 495 nm.
- Impostare la modalità cinetica su una durata di lettura di 40 minuti (2400 secondi). Impostare l'intervallo di lettura cinetica al minimo consentito dal software e dallo strumento.
- La misurazione deve essere avviata subito dopo aver inserito i campioni.
- Per stabilire come calcolare una misurazione del tasso di variazione (pendenza) dal set di dati, consultare il manuale del software. Per le finalità di questo saggio, ciò si ottiene generalmente eseguendo una regressione lineare sui dati cinetici nell'intervallo di tempo suggerito. Per impostare il calcolo della regressione lineare da eseguire nell'intervallo compreso tra 1900 e 2400 secondi, utilizzare la funzione "slice" (taglio) del software.

**8.2 Etichettatura delle provette**

- Etichettare una provetta vuota per ogni campione di siero di paziente da analizzare.
- Etichettare una provetta di reagente Fungitell STAT® per ogni campione di siero di paziente da analizzare.
- Etichettare una provetta di reagente Fungitell STAT® per lo standard Fungitell STAT®.

**8.3 Preparazione del campione di siero del paziente**

- Vortexare i campioni di siero del paziente per almeno 20 secondi per garantirne l'omogeneità. *Nota: il processo di congelamento può generare eterogeneità nei campioni dovuta alla rimozione di acqua dal campione, con conseguente esclusione dei soluti, durante la formazione del cristallo di ghiaccio.*
- Alla corrispondente provetta vuota etichettata aggiungere il campione di siero del paziente e la soluzione alcalina pre-trattamento in rapporto 1:4. I volumi consigliati sono 50 µL di campione paziente e 200 µL di soluzione alcalina pre-trattamento. *Nota: la soluzione alcalina pre-trattamento converte i glucani a tripla elica in glucani a singola filamento<sup>14,15</sup> che nel saggio risultano più reattivi. Inoltre, il suo pH alcalino inattiva le proteasi e gli inibitori presenti nel siero che potrebbero interferire con il saggio<sup>24</sup>.*
- Vortexare per 15 secondi e coprire.

**8.4 Preparazione dello standard Fungitell STAT®**
*Nota: ciascun prodotto (lotto costituito da standard Fungitell STAT® e reagente Fungitell STAT®) viene testato e rilasciato in maniera indipendente. È importante, quindi, utilizzare i volumi specifici per il n. di lotto della soluzione di ricostituzione e della soluzione alcalina pre-trattamento. Questi volumi sono indicati sull'etichetta della confezione dello standard Fungieill STAT®, sul certificato di analisi del prodotto Fungitell STAT® e sono disponibili anche sul sito Web di ACC. Suggerimento: prima di iniziare il saggio, annotare queste informazioni nella guida visiva rapida.*

- Ricostituire una fiala di standard Fungitell STAT® con il volume specifico per il numero di lotto dell'acqua per reagente LAL e vortexare per 15 secondi.
- Aggiungere il volume specifico per il numero di lotto di soluzione alcalina pre-trattamento.
- Vortexare per 15 secondi e coprire.

**8.5 Incubazione di pretrattamento nel lettore di provette**
Incubare le provette con i campioni di siero del paziente (preparate come descritto al punto 8.3) e la fiala dello standard Fungitell STAT®(preparata come al punto 8.4) per 10 minuti a 37 °C.
Nota: sullo strumento PKF08 è presente un indicatore rosso che diventa verde con l'inserimento di una provetta in un pozzetto. Inserire la provetta completamente fino a quando l'indicatore non diventa verde.

⚠ Attenzione, le provette sono fragili. In caso di penetrazione di liquidi e schegge di vetro in una stazione di misurazione dello strumento PKF08, contattare il servizio tecnico di Associates of Cape Cod, Inc.

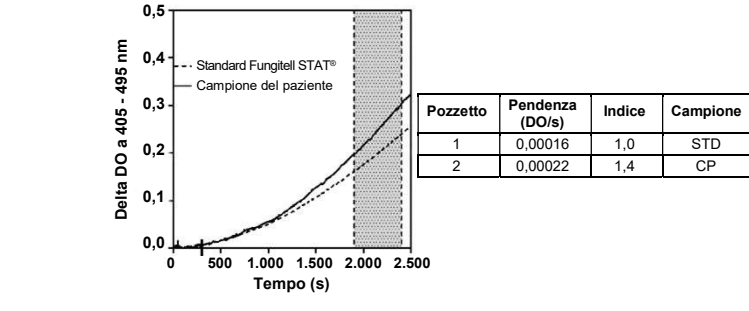
**8.6 Preparazione delle provette di reagente Fungitell STAT®**

- Ricostituire ciascuna fiala di reagente Fungitelll STAT® (etichettata come precedentemente spiegato al punto 8.2) con 300 µL di acqua per reagente LAL.
- Vortexare delicatamente per **non più** di 5 secondi. *Nota: il reagente Fungitelll STAT® contiene un certo numero di proteine attive necessarie per il saggio e per questo è consigliabile manipolare la soluzione con cura. Per i dispositivi vortex si consiglia di impostare un massimo di 2000 rpm. Non miscelare più del necessario.*
- Al termine della pre-incubazione:
  - Trasferire 75 µL di soluzione per ciascun campione di siero del paziente nella corrispondente provetta contenente il reagente Fungitell STAT®.
  - Trasferire 75 µL di standard Fungitelll STAT® nelle provetta corrispondente contenente il reagente Fungitelll STAT®.
  - Vortexare tutte le provette per **non più** di 5 secondi e coprire.

**8.7 Avvio della sessione analitica**

- Inserire le provette nel lettore verificando che ognuna di esse sia posizionata nell'apposito pozzetto.
- Avviare la lettura cinetica per un periodo di 40 minuti a 37 °C.

**9 Calcolare i risultati**
**9.1 Principio di misurazione**
I risultati del saggio Fungitell STAT® devono essere usati come dati ausiliari nella diagnosi delle infezioni fungine invasive. I tassi di variazione standard del campione del paziente e di Fungitell STAT® vengono ricavati calcolando la pendenza (tasso di variazione) tra 1900 e 2400 dal delta dei risultati di DO a 405 - 495 nm. I risultati dell'indice Fungitelll STAT® si ottengono dividendo la pendenza del campione del paziente per la pendenza dello standard Fungitelll STAT® (si veda la Figura 2).



**Figur 2. Esempio di curve cinetiche per Fungitell STAT® e analisi dei dati**
L'area evidenziata in grigio è l'area di determinazione della pendenza (da 1900 a 2400 secondi), la linea continua rappresenta un campione del paziente e la linea tratteggiata rappresenta lo standard Fungitell STAT®. La pendenza del campione (ossia 0,00022 DO/s) diviso la pendenza dello standard Fungitell STAT® (ossia 0,00016 DO/s) genera un indice del campione di 1,4.

**9.2 Quando si utilizza PKF08 con il software BG Analytics®:**

- L'esame dei criteri di controllo qualità viene effettuato automaticamente dal software. Il risultato viene visualizzato nel referto finale.
- Per le sessioni analitiche valide, il software BG Analytics® genera un valore di indice per ciascun campione oppure assegna al campione un risultato nettamente positivo o negativo.
- Se nella valutazione dei risultati il software mostra indicazioni di parametri non validi, attenersi alle istruzioni riportate nel manuale del software BG Analytics®.

**9.3 Quando si utilizza un altro software:**
Verificare che siano soddisfatti tutti i criteri di controllo qualità.

**10. Controllo qualità**
Di seguito sono riportati i criteri di controllo qualità per lo standard Fungitell STAT® e i risultati dei campioni di siero del paziente, compresi degli esempi di forme delle curve cinetiche attese. Questi criteri di controllo qualità sono stati convalidati durante gli studi presentati nella sezione Caratteristiche delle prestazioni.

- Per tutti i pozzetti**, confermare la corretta assegnazione del numero di pozzetto allo standard Fungitell STAT® o al campione

- Per il risultato dello standard Fungitell STAT®**,
  - il coefficiente di correlazione (r) deve essere ≥ 0,980 e
  - la pendenza deve rientrare nell'intervallo di pendenze atteso pari a 0,00010 - 0,00024 DO/secondo. *Se lo standard Fungitelll STAT® non soddisfa i criteri n. 1 e n. 2, la sessione analitica si considera non valida e tutti i campioni devono essere nuovamente preparati e analizzati.*

- Per tutti i risultati dei campioni del paziente, procedere come segue:**
  - Stabilire se il risultato ricade al di fuori dell'intervallo di misurazione del saggio**
    - Il risultato potrebbe non rientrare nell'intervallo sul lato **positivo** se:
      - l'intercetta Y è positiva e
      - la curva cinetica supera 0,4 DO prima di 1000 secondi.
      - Il risultato potrebbe non rientrare nell'intervallo sul lato **negativo** se:
        - la curva cinetica è positiva dopo 500 secondi e
        - ha una DO ≥ 0,00 e < 0,07 al termine del test.

*Se il risultato del campione soddisfa entrambi i criteri di esclusione dall'intervallo sia sul lato positivo sia sul lato negativo, non occorre completare la valutazione dei criteri generali di CQ descritti di seguito né calcolare il valore di indice. Tutti i risultati esterni all'intervallo sul lato positivo devono essere refertati come "Positivi" e tutti quelli esterni all'intervallo sul lato negativo come "Negativi".*

