Analyse af (1→3)-β-D-glukan i serum

FUNGITELL® ANALYSE

Brugsanvisning

℞only

IVD

Σ 42

ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Telefon: (508) 540-3444
Gratis: (888) 395-2221
Fax: (508) 540-8680
Teknisk support: (800) 848-3248
Kundeservice: (800) 525-8378

PN001268-da Rev12 REF FT001 2023-06-13

Besøg www.acciusa.com for en brugsanvisning på dit sprog.
Produktet er kun til in vitro-diagnostisk og professionel brug.

1. Tilsigtet brug

Fungitell® analysen er en protease zymogen-baseret kolorimetrisk analyse til kvalitativ påvisning af (1→3)-β-D-glukan i serum hos patienter med symptomer på, eller medicinske tilstande, der gør patienter modtagelige for invasiv svampeinfektion. Serumkoncentrationen på (1→3)-β-D-glukan, en primær komponent i cellevæggen i forskelligartede medicinsk vigtige svampetyper[1], kan anvendes som en hjælp ved diagnosticering af dybtliggende mykoser og fungæmier[2]. Et positivt resultat angiver ikke, hvilken svampeslægt kan være årsag til infektionen.

(1→3)-β-D-glukan titere skal benyttes sammen med andre diagnostiske procedurer, såsom mikrobiologisk kultur, histologiske undersøgelser af biopsiprøver og radiologiske undersøgelser.

Vigtigt
Videregiv venligst disse oplysninger til den rekvirerende læge: *Visse svampearter som f. eks. slægten Cryptococcus, der producerer meget lave niveauer af (1→3)-β-D-glukan, vil muligvis ikke resultere i, at (1→3)-β-D-glukan i serum er eleveret nok til at blive påvist med analysen[1,4]. Infektioner med svampe fra mugordenen Mucorales som f.eks. Absidia, Mucor og Rhizopus[1,4], som ikke vides at producere (1→3)-β-D-glukan, udviser ligeledes lave (1→3)-β-D-glukantitere i serum. Derudover producerer gæringsfasen af Blastomyces dermatitidis kun lidt (1→3)-β-D-glukan, hvilket muligvis ikke vil blive påvist i analysen[5].*

Inkluder denne erklæring, når testresultaterne for Fungitell® analysen rapporteres.

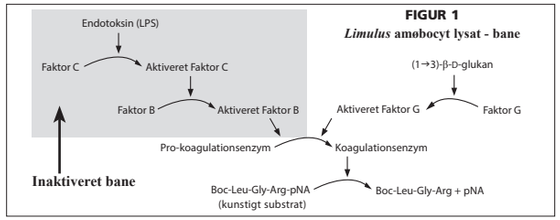
2. Oversigt og forklaring

Svampeinfektioner fra opportunistiske patogener ses i stigende grad, og især hos immunsupprimerede patienter[6,7,8]. Invasive svampesygdomme, såsom opportunistiske infektioner, forekommer hyppigt hos patienter med hæmatologiske maligniteter og AIDS og er årsagen til et voksende antal nosokomielle infektioner, især blandt organtransplantationspatienter og andre patienter, der får immunsupprimerende behandlinger[9,10]. Mange svampesygdomme erhverves ved indånding af svampesporer fra jord, planteaffald, ventilationssystemer og/eller udsatte områder. Nogle opportunistiske svampe er til stede i/på menneskehud, tarmkanal og slimhinder[11,12]. Diagnosticering af invasive mykoser og fungæmier baseres normalt på ikke-specifikke diagnostiske eller røntgenteknikker. Biologiske markører for svampeinfektioner er for nylig blevet gjort tilgængelige som diagnostiske metoder[2].

Opportunistiske svampepatogener inkluderer *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* og *Pneumocystis jirovecii*. Det (1→3)-β-D-glukan, der dannes af disse og andre organismer, er påviselige med Fungitell® analysen[1,8,13,14].

3. Procedurens principper

Fungitell® analysen måler (1→3)-β-D-glukan. Analysen er baseret på en modificeret *Limulus* amøbocyt lysat (LAL)-bane[15,16,17,18], Figur 1. Fungitell® reagenset er modificeret for at eliminere bakteriel endotoksinreaktivitet og således for kun at reagere på (1→3)-β-D-glukan gennem den Faktor-G-medierede bane. (1→3)-β-D-glukan aktiverer Faktor G, et serinprotease zymogen. Det aktiverede Faktor G omdanner det inaktive pro-koagulationsenzym til det aktive koagulationsenzym og kløver efterfølgende para-nitroanilid (pNA) fra det kromogene peptidsubstrat, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, og der dannes en kromofor, para-nitroanilin, der absorberer ved 405 nm. Fungitell® kinetisk analyse, som er beskrevet herunder, er baseret på bestemmelse af raten af stigning i optisk densitet, der produceres af en prøve. Denne rate fortolkes imod en standardkurve for at give estimater af (1→3)-β-D-glukankoncentrationen i prøven.



FIGUR 1
***Limulus* amøbocyt lysat - bane**

4. Materialer der følger med Fungitell® sættet

Fungitell® sættet er til in vitro diagnostisk brug. De følgende materialer, som følger med hvert sæt, er tilstrækkelige til analysering af 110 brønde på to mikrotiterplader (55 brønde på hver):

- Fungitell® reagens, et frysetørret (1→3)-β-D-glukan specifikt LAL (to hætteglas). *Fungitell® reagenset består af Limulus (dvs. dolkhale) amebocytlysat og Boc-Leu-Gly-Arg-pNA kolorimetrisk substrat. Det indeholder ikke proteiner fra mennesker eller pattedyr.*
- Pyrosol® rekonstitutionsbuffer (to hætteglas). Yderligere hætteglas med Pyrosol rekonstitutionsbuffer (katalognummer BC051) kan købes for sig. *Den består af 0,2 mol Tris-buffer.*
- Glukanstandard, frysetørret (1→3)-β-D-glukan fra pachyman (to hætteglas). *Volumen af reagensvand, der skal tilsættes, er angivet på hætteglassets mærkat. Den er kalibreret op mod en intern referencestandard.*
- LAL-reagensvand (LRW) (to flasker)
  Bemærk: 20 ml vand af reagenskvalitet (RGW) og LRW i hætteglas svarer til hinanden.
- Alkalisk forbehandlingsopløsning (to hætteglas), som indeholder *0,125 mol KOH og 0,6 mol KCl*

Alle ovenstående materialer, med undtagelse af standarden, er fri for interfererende niveauer af (1→3)-β-D-glukan.

5. Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

Alle materialer skal være fri for interfererende glukan.

- Pipettespidser* (250 µL - katalog-nr. PPT25, 1000 µL - katalog-nr. PPT10)
- Pipetter i stand til at levere 5-25 µL og 100-1000 µL
- Gentagelsespipette med sprøjtespidser i stand til at levere 100 µL
- Reagensglas* til klargøring af standardserie (kalibreringskurve) og kombinering af serumbehandlingsreagenser. (12 x 75 mm - katalog-nr. TB240 eller 13 x 100 mm - katalog-nr. TB013)
- Inkubationspladelæser (37 °C) med mulighed for aflæsning ved 405 nm (helst med mulighed for dobbelt bølgelængdemåling ved 405 og 490 nm) med et dynamisk område op til mindst 2,0 absorbansenheder, kombineret med relevant computerbaseret software til kinetisk analyse.
- Sterile, glukanfri hætteglas til alikvotering af prøver. Der kan bruges hætteglas, der er certificeret til at være fri for RNAse, DNAse og pyrogener.
- Parafilm®
- 96-brøndsmikroplader* **Bemærk:** Fungitell® analysen er blevet valideret med plader, der har følgende karakteristika: Polystyren, sterile, ubelagte, fladbundede, uden interferende betaglukan til ACC-specifikationer og individuelt indpakkede.

* Disse produkter fra Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) er certificerede fri for interfererende glukaner.

6. Opbevaring af reagenser

- Opbevar alle reagenser, som leveret, ved 2-8 °C på et mørkt sted.
- Rekonstitueret Fungitell® reagens skal opbevares ved 2-8 °C og anvendes inden for 2 timer. Alternativt kan rekonstitueret Fungitell® reagens nedfryses ved -20 °C i op til 20 dage, optøs én gang og anvendes.

7. ⚠ Advarsler og forholdsregler

- Ingen materialer må pipetteres med munden. Undgå at ryge, spise og drikke i områder, hvor der håndteres prøver eller sætreagenser.
- Følg driftsmæssige og lokale sikkerhedsregler.
- Brug beskyttelseshandsker ved håndtering af biologiske prøver, der kan være infektiøse eller farlige. Den behandskede hånd skal til enhver tid betragtes som kontamineret. Hold din behandskede hånd væk fra dine øjne, mund og næse. Brug øjenbeskyttelse og medicinsk mundbind, hvis der er mulighed for aerosolforurening.
- **Bemærk:** Sæt med beskadiget indhold må ikke anvendes.
- Bortskaffelse: Rester af kemikalier og forberedelser betragtes almindeligvis som risikoaffald. Bortskaffelse af denne type affald er reguleret af nationale og regionale love og bestemmelser. Kontakt de lokale myndigheder eller affaldshåndteringsvirksomheder for råd om bortskaffelse af risikoaaffald.
- **Sikkerhedsdatablade** for alle Fungitell® sætkomponenter kan downloades på ACC's website: www.acciusa.com.

7.1 Proceduremæssige forholdsregler

Fungitell® analysen kræver nøje opmærksomhed omkring teknikker og testmiljø. Det er yderst vigtigt for analysens effektivitet, at teknikeren oplæres grundigt i analysemetoden og i undgåelse af kontamination.

- Brug god laboratoriepraksis i henhold til gældende kliniske retningslinjer. Denne analyse er følsom over for kontaminering og unøjagtig pipettering.
- Etabler et rent miljø at udføre analysen i.
- Bemærk, at glukan - såvel som kontamination med svampepartikler fra menneskekroppen, beklædning, beholdere, vand og luftbåret støv - kan interferere med Fungitell® analysen.
- Mulige kontamineringskilder: celluloseholdige materialer, såsom gaze, papirservietter og pap, glaspipetter med bomuldspropper og pipettespidser med cellulosefiltre. Kirurgisk gazevæv og svampe kan også frigive store mængder (1→3)-β-D-glukan[21,22]. Se afsnittet Begrænsninger for andre patientrelaterede kontamineringskilder for testen.
- Brug ikke materialer efter udløbsdatoen.

7.2 Håndtering af prøver

- Indsamling af blodprøver og forberedelse af serum skal ske i henhold til gældende lokale bestemmelser. Prøvetagning: Blodprøver skal indsamles i sterile serumklargøringsglas eller serumseparationsglas (SST) til klargøring af serum.
- Opbevaring af prøver: Serumprøver kan opbevares ved 2-8 °C i op til 15 dage eller nedfryses ved -20 °C i op til 27 dage eller -80 °C i op til 4 år.
- Mærkning af prøver: Prøver skal markeres tydeligt i overensstemmelse med institutionens godkendte praksis.

8. Procedure

8.1 Instrumentindstilling og analyseprogrammering

Indstillinger kan variere afhængigt af instrumenter og software. Generelt gælder følgende: Indstil pladelæsersoftwaren til at indsamle data i Vmean tilstand. Kontroller softwaremanualen for de korrekte indstillinger for at sikre, at den beregnede værdi er den gennemsnitlige rate af optisk densitetsændring for alle indsamlede datapunkter. Indstil aflæserens interval til det minimalt tilladte af softwaren/instrumentet over testens 40 minutters varighed. Softwarens bølgelængdehastighed skal være 405 nm minus baggrunden på 490 nm. Det anbefales at anvende begge bølgelængder, men hvis dobbelt bølgelængdeaflæsning ikke er tilgængeligt, aflæses testen ved 405 nm, og hver patientprøves kinetiske kurve undersøges for tegn på inteferens (se afsnit 9.0 for nærmere oplysninger). Inkubationstemperaturen indstilles til 37 °C. Indstil blanding/ryst af pladen til at finde sted 5 – 10 sekunder før aflæsningen starter. Indstil kurvetilpasningen til "linear/linear" (Lineær/lineær) eller tilsvarende. Aflæsningen bør starte uden forsinkelse.

8.2 Klargøring af sættets glukanstandard.

a. Oplø et hætteglas glukanstandard med den mængde reagensvand (LRW), der er angivet på hætteglasset for at få en opløsning på 100 pg/ml. Bland i vortexmixer i mindst 30 sekunder ved mellem- til mellemhøj hastighed for at rekonstituere standarden (opløsning 1). Glukanopløsningen skal opbevares ved 2-8 °C og anvendes inden for tre dage. Trin b - e herunder viser et eksempel på klargøring af standarder til dannelse af en kurve.
b. Klargør 50 pg/ml standard (opløsning 2) ved at blande 500 µL LRW og 500 µL af opløsning 1 i et reagensglas uden glukan (opløsning 2). Bland i vortexmixer i mindst 10 sekunder.
c. Klargør 25 pg/ml standard (opløsning 3) ved at blande 500 µL LRW og 500 µL af opløsning 2 i et reagensglas uden glukan (opløsning 3). Bland i vortexmixer i mindst 10 sekunder.
d. Klargør 12,5 pg/ml standard (opløsning 4) ved at blande 500 µL LRW og 500 µL af opløsning 3 i et reagensglas uden glukan (opløsning 4). Bland i vortexmixer i mindst 10 sekunder.
e. Klargør 6,25 pg/ml standard (opløsning 5) ved at blande 500 µL LRW og 500 µL af opløsning 4 i et reagensglas uden glukan (opløsning 5). Bland i vortexmixer i mindst 10 sekunder.

8.3 Åbn den alkaliske forbehandlingsopløsning.

Den alkaliske forbehandlingsopløsning konverterer tredobbelte helix-glukaner til enkeltstrengede glukaner[17,18], som er mere reaktive i analysen. Desuden tjener den alkaliske pH som et middel til inaktivering af serumproteaser og inhibitorer, der kan påvirke analysen.[24]

Kassér hætteglasset (i overensstemmelse med laboratoriets procedurer), medmindre det skal anvendes til efterfølgende test, hvorfor det i så fald dækkes til med Parafilm, og den side af Parafilm anvendes, der vendte mod papirlaget.

8.4 Opsætning af mikrotiterplade

Opsæt mikrotiterpladens layout i softwaren med standarder (Std), negative kontroller (Neg) og 21 prøver (Spl). Følgende layout anbefales:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		STD1 500	STD1 500		SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	
C		STD2 250	STD2 250		SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19	
D		STD3 125	STD3 125		SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	
E		STD4 62,5	STD4 62,5		SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20	
F		STD5 31,25	STD5 31,25		SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	
G		Neg	Neg		SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	
H												

Indtast standardens koncentrationer i softwaren som hhv. 500, 250, 125, 62,5 og 31 pg/ml.

Vær opmærksom på, at de indtastede standardkoncentrationer er fem gange højere end koncentrationerne klargjort i afsnit 8.2 ovenfor. Dette skyldes, at det standardvolumen, der anvendes i analysen, er 25 µL pr. brønd, hvilket er fem gange mere end volumenet af den anvendte serumprøve (se afsnit 8.5 b herunder). Serumprøven fortyndes således effektivt fem gange i forhold til standarden. Multiplikation af standardkoncentrationerne med fem kompenserer for denne fortynding.

Bemærk: De ydre brønde kan bruges, hvis det er demonstreret, at ydeevnen af de ydre brønde svarer til ydeevnen af de indre brønde.

Bemærk: De negative kontroller bruges ikke i standardkurven.

8.5 Tilsætning af serum og alkalisk forbehandlingsopløsning.

a. Optø frosne serumprøver ved stuetemperatur. Bland alle prøver grundigt i vortexmixer – i mindst 30 sekunder ved mellem- til mellemhøj hastighed.
b. Overfør 5 µL af serumprøven til hver af de dertil beregnede brønde (Uk), som minimum i duplikat. Gentag for hver serumprøve.
c. Tilsæt 20 µL alkalisk forbehandlingsopløsning til hver brønd med serum. Sørg for, at serum og dråberne af forbehandlingsopløsning kommer i kontakt med hinanden.
   Bemærk: Trin b og c kan udføres i omvendt rækkefølge afhængigt af teknikerens præference.
   Bemærk: For at undgå utilsigtet kontamination skal låget lægges tilbage på mikropladen, efter prøver og reagenser efter blevet overført til brøndene.
d. Ryst pladen i 5 – 10 sekunder for at blande brøndindholdet (aflæserens pladerystningsfunktion kan benyttes), og inkuber derpå i 10 minutter ved 37 °C i inkubatorpladeläseren.

8.6 Rekonstituering af Fungitell® reagens.

Bemærk: Dette kan med fordel udføres, mens forbehandlingsinkubationen er i gang. Ensartet planlægning af rekonstitueringen vil forbedre reproducerbarheden, da reaktionen af Fungitell® starter efter rekonstitueringen, omend på et lavt niveau.

Rekonstituer ét hætteglas Fungitell® reagens ved at tilsætte 2,8 ml LRW og derpå tilsætte 2,8 ml Pyrosol-rekonstitutionsbuffer ved brug af 1000 µL pipetten. Dæk hætteglasset til med Parafilm, og brug den side af Parafilm, der vendte mod papirlaget. Omryst hætteglasset forsigtigt for at opløse indholdet helt – brug ikke vortexmixer.

8.7 Tilsætning af negative kontroller og glukanstandarder.

Ved afslutningen af inkubationen af serumforbehandlingsopløsningen (afsnit 8.5 d) fjernes pladen fra inkubationspladeaflæseren, og standarder og negative kontroller tilsættes til pladen. Anbefalet standardkoncentrationsmønster:

a. Tilsæt 25 µL LRW til brønd G2 og G3.
b. Tilsæt 25 µL af 6,25 pg/ml standardopløsning 5 til brønd F2 og F3, mærket som 31,25 pg/ml.
c. Tilsæt 25 µL af 12,5 pg/ml standardopløsning 4 til brønd E2 og E3, mærket som 62,5 pg/ml.
d. Tilsæt 25 µL af 25 pg/ml standardopløsning 3 til brønd D2 og D3, mærket som 125 pg/ml.
e. Tilsæt 25 µL af 50 pg/ml standardopløsning 2 til brønd C2 og C3, mærket som 250 pg/ml.
f. Tilsæt 25 µL af 100 pg/ml standardopløsning 1 til brønd B2 og B3, mærket som 500 pg/ml.

8.8 Fungitell® reagenstilsætning og pladeinkubationsprocedure.

a. Tilsæt 100 µL Fungitell® reagens til hver brønd (indeholdende negative kontroller, standarder og prøver) med gentagelsespipetten.
b. Sæt pladen i mikropladeläseren (afbalanceret til 37 °C), tag låget af, og ryst den i 5-10 sekunder.

Aflæs pladen **uden låg** ved 405 nm minus 490 nm i 40 minutter ved 37 °C. Bemærk: Hvis instrumentet ikke giver tid til at tage låget af mellem rystning og aflæsning, skal pladen rystes med låget taget af for at få en aflæsning uden låget på.

9. Beregn resultaterne.

Indsaml data, og analysér på følgende måde: Undersøg prøvernes kinetiske plot, og se efter andre mønstre end en jævn stigning svarende til standardernes. Ugyldiggør plot, der viser tegn på optisk interferens (f.eks. de kinetiske mønstre følger ikke standardernes mønstre). Beregn den gennemsnitlige optiske densitetsændring (milli-absorbansenheder pr. minut) for alle punkter mellem 0 og 40 minutter (gøres af softwaren). Interpoler prøvens (1→3)-β-D-glukan koncentrationer fra standardkurven (gøres af softwaren).

10. Kvalitetskontrol

- Korrelationskoefficienten (r) af standardkurven (lineær vs. lineær) bør være ≥ 0,980.
- Brøndene med 25 µL LRW udgør de negative kontroller. Negative kontroller skal have rateresultatværdier (f.eks. milliabsorbans enheder pr. minut) under 50 % af de laveste standardrater. Hvis ikke, skal analysen gentages med nye reagenser.
- Håndtering af komplekse prøver. Hvis analytikeren observerer usædvanlig kinetik i en test af en prøve, f.eks. en prøve der er uklar, misfarvet eller grumset (såsom prøver, der er stærkt hæmolyserede, lipæmiske eller som indeholder meget bilirubin), skal prøven fortyndes med LRW og testes igen. Fortyndingen inkluderes i rapporteringen af resultater ved at gange resultatet med fortyndingsfaktoren. **Fortyndingsfaktoren indtastes typisk i softwareindstillingen for prøven, og korrektionen sker automatisk.**

Bemærk:
- Hver bruger af analysen bør etablere et kvalitetskontrolprogram for at sikre effektiv udførelse af testen i overensstemmelse med de gældende regulativer på stedet.
- Det tilrådes at analysere serumkontrolprøver (negativ, tæt på grænseværdien eller stærkt positiv) i konteksten af yderligere laboratoriekontroller og god laboratoriepraksis. Disse er ikke inkluderet i Fungitell® sættet.

11. Fortolkning af resultater

NEGATIVT RESULTAT
(1→3)-β-D-glukanværdier <60 pg/ml fortolkes som negative resultater.

Laboratoriet som udfører testen skal informere den rekvirerende læge om at ikke alle svampeinfektioner resulterer i eleverede niveauer af (1→3)-β-D-glukan i serum. Visse svampearter som slægten Cryptococcus[3,4] producerer meget lave niveauer af (1→3)-β-D-glukan. Mucorales, såsom *Absidia, Mucor* og *Rhizopus*[1,4] vides ikke at producere (1→3)-β-D-glukan. Tilsvarende producerer *Blastomyces dermatitidis*, i gæringsfasen, kun lidt (1→3)-β-D-glukan, og blastomykosepatienter har normalt ikke-påviselige niveauer af (1→3)-β-D-glukan i Fungitell® analysen[5].

UBESTEMMELIGT RESULTAT
Værdier fra 60 til 79 pg/ml betragtes som inkonklusive. Yderligere prøvetagning og analyse af sera anbefales. Jævnlig prøvetagning og analysering øger anvendeligheden ved diagnosticering.

POSITIVT RESULTAT
(1→3)-β-D-glukanværdier ≥ 80 pg/ml fortolkes som et positivt resultat. Et positivt resultat definerer ikke tilstedeværelse af sygdom og skal bruges sammen med andre kliniske fund for at danne grundlag for en diagnose.

12. Testens begrænsninger

- Svampeinfektionens placering i vævet[19], indkapsling og mængden af (1→3)-β-D-glukan, der produceres af bestemte svampe, kan have indflydelse på serumkoncentrationen i denne analyt. En reduceret evne til at overføre (1→3)-β-D-glukan til blodet kan nedsætte analysens evne til at påvise nogle svampeinfektioner.
- Nogle personer har eleverede niveauer af (1→3)-β-D-glukan, som falder inden for den ubestemmelige zone. I disse tilfælde anbefales yderligere overvågningstestning.
- Hyppigheden af patienttestning afhænger af den relative risiko for svampeinfektion. En prøvefrekvens på mindst to til tre gange om ugen anbefales for risikopatienter.
- Positive resultater er fundet i hæmodialysepatienter[19,20,38], patienter behandlet med visse fraktionerede blodprodukter som serumalbumin og immunglobuliner [23,25] og i prøver eller hos patienter, der eksponeres for glukanholdig gaze og tamponer. Patienter kræver 3 – 4 dage for at genoprette basislinjeniveauer af (1→3)-β-D-glukan i serum, efter kirurgisk eksponering for tamponer og gaze indeholdende (1→3)-β-D-glukan[21,22]. Derfor skal tilrettelæggelsen af prøvetagningen for kirurgiske patienter tages i betragtning.
- Prøver indsamlet med hæl- eller fingerprik er uacceptable, da den alkoholvædede gaze, der bruges til at klargøre indstiksstedet (og potentielt ansamlinger af blod på hudoverfladen) har vist sig at kontaminere prøverne. I studier er der til dato ikke blevet observeret forskelle mellem prøver taget fra et anlagt kateter og fra venepunktur[26,27].
- For en omfattende gennemgang af faktorer, der bidrager til falsk positive resultater for (1→3)-β-D-glukan, henvises til Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)[39].
- Testniveauer blev etableret for voksne patienter. Normale værdier og cut-off-værdier for spædbørn og børn er ved at blive undersøgt[28,29].

13. Ydelseskarakteristik

13.1 Grænseværdier og forventede værdier

Et multi-center, prospektivt forsøg[11], der blev udført for at bestemme Fungitell® analysens diagnostiske sensitivitet og diagnostiske specificitet (se Sammenlignende analyse nedenfor) har vist, at betaglukanværdier er eleverede ved en række svampeinfektioner. Når tegn og symptomer er til stede ved 80 pg/ml-niveauet eller højere, varierer den prædiktive værdi for, at patienten er positiv for en svampeinfektion mellem 74,4 og 91,7 %. Ved manglende tegn og symptomer ved mindre end 60 pg/ml varierer de negative prædiktive værdier mellem 65,1 og 85,1 %.

13.2 Klinisk ydelse

Et multi-center, prospektivt forsøg for at validere Fungitell® analysens ydelseskarakteristik blev udført[21]. Testen blev sammenlignet med andre standardmetoder til påvisning (dvs. bloddyrkning, histopatologisk undersøgelse af biopsiprøver og radiologiske tegn) af mykoser og fungæmier.

Trehundrede og nioghalvtres (359) patienter blev testet med analysen. Der blev indsamlet en enkelt prøve fra hver patient. Patienter i lavrisikogruppen inkluderede tilsyneladende raske personer foruden personer på forsøgscentrene, som var indlagt på hospitaler af andre årsager end svampeinfektioner. Patientinkludering fandt sted på seks centre i USA. Fire centre udførte analysen og testede 285 prøver i alt. ACC testede alle 359 prøver to gange men anvendte kun anden rundes resultater til at vurdere analysens ydelse. Resultaterne af anden rundes analyser afveg ikke statistisk fra første runde.

- **Diagnostisk sensitivitet**
  Sensitiviteten for hele patientpopulationen (359), inklusive cryptococcosis-patienter, var 65,0 % ([60,1 - 70,0 % 95 % konfidensinterval (CI)]) (Tabel 1).

- **Diagnostisk specificitet**
  Specificiteten var 81,1 % (77,1 - 85,2 % CI). Når de 170 patienter, der var negative for svampeinfektion og tilsyneladende var raske, blev analyseret, var specificiteten 86,5 % med analysen (82,8,% - 90,1 % CI). Når man inkluderede de yderligere 26 patienter, som blev erklæret negative for svampeinfektion men som havde andre sygdomme, blev der observeret en specificitet på 81,1 % (77,1 - 85,2 % CI).

Tabel 1 ACC-testresultater ved 60-80 pg/ml grænseværdien pr. forsøgscenter

Forsøgscenter	Påvist/sandsynlig **sensitivitet** >=80 pg/ml			**Specificitet** <60 pg/ml			Flertydig 60<=X<80	Total
	Pos/klin. pos	**Sensitivitet**	Positiv prædiktiv værdi	Neg/klin. neg	**Specificitet**	Negativ prædiktiv værdi		
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	Ikke relevant	0/0	Ikke relevant	0,0	0	1
Total	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Når resultaterne indhentet af ACC (359 prøver) og forsøgscentrene (285 prøver) sammenlignes med kliniske diagnoser, er sensitiviteten 64,3 % (58,8 % - 69,9 % CI) for ACC og 61,5 % (55,9 % - 67,2 % CI) for centrene. Specificiteten er 86,6 % (82,7 % - 90,6 % CI) for ACC sammenlignet med 79,6 % (74,9 % - 84,3 % CI) for centrene

Candidiasis
107 patienter blev erklæret positive for candidiasis i det prospektive forsøg. 83 af de 107 var positive med Fungitell® analysen.

Ethundrede og femoghalvfjerds candidiasis library-prøver blev sendt til Associates of Cape Cod, Inc. 145 af de 175 var positive med analysen.

Aspergillosis
I alt 10 patienter var positive for aspergillosis. 8 af de 10 var positive med analysen.

Fusariosis
Tre patienter var positive for fusariosis. 2 af de 3 var positive med analysen.

Behandling med antifungal medicin
Tilstedeværelse eller fravær af behandling med antifungal medicin havde ingen statistisk signifikant effekt på analysesensitivitet. 118 patienter blev erklæret positive for invasiv svampeinfektion og var under antifungal behandling. 82 var positive med analysen (sensitivitet 69,5 %, 61,2 % - 77,8 % CI). Desuden blev fireogtyve (24) patienter erklæret positive, men de var ikke under behandling med antifungal medicin. 18 var positive med analysen (sensitivitet, 75 %, 57,7 % - 92,3 % CI).

13.3 Testkorrelationer

Fire forsøgscentre udførte analysen på i alt 285 prøver. Forsøgscentrenes resultater korrelerede kvantitativt ved 96,4 % med resultaterne fra Associates of Cape Cod, Inc. Korrelationerne mellem Associates of Cape Cod, Inc. og de forskellige forsøgscentre varierede mellem 90,6 % og 99,2 %.

13.4 Præcision

Fungitell® analysen blev evalueret for præcision (dvs. repeterbarhed og reproducerbarhed) ved anvendelse af ti (10) forskellige prøver, som hver blev analyseret af tre forsøgscentre på tre forskellige dage. Variationen inden for analysen lå i området 0,9 % til 28,9 % og tjente som en måling af repeterbarhed. Værdierne inden for analysen lå i området 3,9 % til 23,8 % og tjente som en måling af reproducerbarhed. De fire (4) negative prøver blev ekskluderet fra begge analyser.

13.5 Måleområde og linearitet

Resultaterne er udtrykt i pg/ml serum og varierer fra ikke-påviseligt (<31 pg/ml) til > 500 pg/ml, og de udskrives af softwaren eller aflæses fra standardkurven. Nøjagtige værdier over 500 pg/ml kræver, at prøven fortyndes med LAL-reagensvand og testes igen. Som angivet i afsnittet Kvalitetskontrol bør korrelationskoefficienten (r) af standardkurven (lineær vs. lineær), der dækker Fungitell® analysens måleområde, være ≥ 0,980, og de negative kontroller bør have rateværdier (f.eks. milliabsorbansenheder pr. minut) under 50 % af den laveste standardrate. Hvis ikke, skal analysen gentages med nye reagenser.

13.6 Interfererende stoffer

De følgende prøvebetingelser kan påvirke nøjagtige resultater af en Fungitell® analyse:
- Misfarvede eller uklare prøver som f.eks. prøver, der er kraftigt hæmolyserede, lipæmiske eller som indeholder meget bilirubin, kan forårsage optisk interferens i analysen. Hvis sådanne prøver testes, bør testresultaterne undersøges for bevis på optisk interferens og/eller usædvanlige kinetiske kurvemønstre.
- Eleverede niveauer af immunglobulin G, som kan forekomme i serum pga. flere myelomer, kan resultere i udfældning i reaktionsblandingen efter tilsætningen af Fungitell® til det forbehandlede serum[30].
- I skrivende stund er der ikke beskrevet nogen anden aktiverende Faktor G ((1→3)-β-glukan-påvisningselement) af Fungitell® reagens end (1→3)-β-glukan. I nogle forsøg, hvor der har været påstande om krydsreaktivitet, har behandling af det formodede aktiveringsmateriale med renset (1→3)-β-glukanase elimineret signalet, hvilket beviste, at den observerede aktivering skyldtes kontaminering (1→3)-β-glukan[15]. Kontaminering med serinproteaser kan også give udslag i frigivelse af paranitroanilin i Fungitell® reaktionsblandinger, men disse inaktiveres som en del af forbehandlingsprocessen.

14. Metaanalyser

Derudover er der publiceret utallige peer-reviewed studier af emnet serum (1→3)-β-D-glukanbaseret støtte til diagnosticering af invasiv svampesygdom, herunder metaanalyser af diagnostisk ydeevne[32,34,35,36,37].

15. Symbolforklaring

	"Anvendes inden"		"Se brugsanvisningen"
N	"Indeholder tilstrækkeligt til "N" test"	EC REP	"Autoriseret repræsentant"
LOT	"Batchkode"	CE	"CE-mærke"
IVD	"Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik"	Rx only	"Receptpligtig"
REF	"Katalognummer"		"Forsigtig"
	"Temperaturbegrænsning"		"Beskyttes mod sollys"
	"Fabrikant"		

16. Autoriserede repræsentanter

Australsk sponsor: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park
201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Australien

Bemærk: Alvorlige hændelser, der er forekommet i relation til produktet, skal indberettes til fabrikanten og den kompetente myndighed i det medlemsland, hvor brugeren og/eller patienten er hjemmehørende.

17. Kontaktoplysninger

Hovedkontor
Associates of Cape Cod, Inc.
124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536-4445 USA
Tlf.: +1 (888) 395-2221 eller +1 (508) 540-3444 • Fax: +1 (508) 540-8680
E-mail: custservice@acciusa.com • www.acciusa.com

Storbritannien
Associates of Cape Cod Int'l., Inc.
Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Storbritannien
Tlf.: (44) 151–547–7444 • Fax: (44) 151–547–7400
E-mail: info@acciuk.co.uk • www.acciuk.co.uk

Europa
Associates of Cape Cod Europe GmbH
Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Tyskland
Tlf.: (49) 61 05–96 10 0

18. Revisionshistorik

Rev. 0 til 11: Ændrede triplikat til duplikat analyse. Erstattede vand af reagenskvalitet med LAL-reagensvand. Kombinerede KCL- og KOH-komponenterne til alkalisk forbehandlingsopløsning. Fjernede mikroplade fra sættet, tilbydes efter behov, men er ikke vedlagt. Ændrede EU-repræsentant og tilføjede australsk sponsor. Mindre præciseringer, formatering, tilføjelse af symboler, yderligere interfererende stoffer.
Revision 12: Fjernede EU-repræsentant, Emergo Europe.

19. Litteraturhenvisninger

1. Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. Medical Mycology 44: 267-272.
2. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Concensus Group. Clin. Inf. Dis. 46: 1813-1821.
3. Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K-I., Ishikawa, N., and 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.
4. Binder, U., Maurer, E., and Lass-Florl, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Clin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl.6): 60-66.
5. Girouard, G., Lachance, C., and 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.
6. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transpl. Infectious Dis. 1999: 1:247-261.
7. Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New England Journal of Medicine. 1998: 338:1741-1751.
8. Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H. Yasuoka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 345: 17-20.
9. Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Micro. Rev. 9: 499-511.
10. Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002: 4 (Suppl. 3):32-37
11. Lass-Florl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.
12. Nucci, M. and Anaissie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.
13. Litvintseva, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grgurich, D.E., Kerkering, T.M., Brandt, M.E., and Park, B.J. Utility of (1-3)-β-D-glucan testing for diagnostics and monitoring response to treatment during the multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. J. Clin. Microbiol. 2015; 53:618-25.
14. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and 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.
15. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.
16. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (1→3)-β-D-Glucans. Carbohydrate Res. 218:167-174.
17. Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-β-D-Glucans in the activation of coagulation factor G from Limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.
18. Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and 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.
19. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. Kidney International 60: 319-323.
20. Kato, A., Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-β-D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
21. 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., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauze types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.
22. Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and 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.
23. 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.
24. Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T, and Kawai, T. 1994. Automated kinetic assay for endotoxin and (1→3)-β-D-Glucan in human blood. Clin. Chim. Acta 226: 109-112.
25. Ogawa, M., Hori, H., Niiguchi, S., Azuma, E., and 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.
26. Racil, Z., Kocmanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, I., and Mayer, J. Difficulties in using 1,3-β-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.
27. Posteraro B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi,M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguinetti, M., and 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.
28. Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., and 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.
29. Goudjil. S., Kongolo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. J. of Materernal-Fetal and Neonatal Med. 26: 44-48.
30. Issa, N.C., Koo, S., Lynch, R.C., Gay, C., Hammond, S.P., Baden, L.R., Ghobrial, I.M., Finkelman, M.A., and 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.
31. Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)-β-D-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin. Inf. Dis. 41: 299-305.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Onishi A1, 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 jiroveci* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012; 50:7-15.
36. 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.
37. He S[1], Hang JP[2], Zhang L[2], Wang F[2], Zhang DC[1], Gong FH[4] 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.
38. Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of 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.
39. Finkelman M. Specificity Influences in (1→3)-β-d-Glucan-Supported Diagnosis of Invasive Fungal Disease. J. Fungi (Basel) 2020 Dec 29;7(1):14

Yderligere litteratur findes på vores website Fungitell.com

En **Hurtig oversigt over analyseproceduren** kan downloades på websitet Fungitell.com på: https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf