


Test pour le (1→3)-β-D-glucane sérique

TEST Fungitell®

Mode d'emploi




ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED

124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536, États-Unis

Téléphone : (508) 540-3444
 (888) 395-2221
 Numéro vert : (508) 540-8680
 Fax : (800) 848-3248
 Assistance technique : (800) 525-8378
 Service client : (800) 525-8378

REF FT001

2021-12-14

 Visiter www.acciusa.com pour obtenir des instructions d'utilisation dans votre langue. *Ce produit est uniquement destiné à une utilisation professionnelle pour le diagnostic in vitro.*

1. Utilisation prévue

Le test **Fungitell**® est un test colorimétrique basé sur un zymogène de protéase pour une détection qualitative du (1→3)-β-D-glucane dans le sérum de patients ayant des symptômes d'infection fongique invasive ou des pathologies médicales les prédisposant à une infection fongique invasive. La concentration du sérum en (1→3)-β-D-glucane, un composant principal de la paroi cellulaire de plusieurs champignons dont l'importance médicale est reconnue¹, pourrait aider à diagnostiquer des mycoses profondes et des fongémies². Un test positif n'indique pas le genre de champignon en cause dans l'infection.

Les dosages du (1→3)-β-D-glucane devraient être utilisées conjointement avec d'autres méthodes diagnostiques, telles que la culture microbiologique, l'examen histologique de biopsies et de radiographies.

Important

Fournir cette information au médecin demandeur : *Certains champignons, du genre **Cryptococcus** qui produisent de très faibles taux de (1→3)-β-D-glucane, pourraient ne pas conduire à un taux de (1→3)-β-D-glucane sérique assez élevé pour être détectés par le test^{3,4}. Les infections dues à des champignons d'ordre **Mucorales** tels que l'**absidia**, le **mucor** et le **rhizopus**^{5,4} qui ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-glucane, produisent également de faibles titres de (1→3)-β-D-glucane sérique. De plus, dans la phase levure le **Blastomyces dermatitidis** produit peu de (1→3)-β-D-glucane et pourrait ne pas être détecté par le test.*

Inclure cela dans les rapports de résultats du test Fungitell®.

2. Résumé et explication

Il y a une croissance de l'incidence des infections fongiques due à des infections opportunistes, notamment chez les patients immunodéfiants^{6,7,8}. Les maladies fongiques invasives, tout comme les infections opportunistes, sont fréquentes parmi les malades du SIDA et ceux présentant des hémopathies malignes et compte pour une nombre croissant des infections nosocomiales, notamment chez les bénéficiaires d'une transplantation d'organe et autres patients recevant des traitements immunosuppresseurs^{9,10}. Plusieurs maladies fongiques sont contractées par l'inhalation de spores fongiques venant du sol, de détritux végétaux, de systèmes de traitement de l'air et des surfaces exposées. Certains champignons opportunistes sont présents dans et sur la peau humaine, le tube digestif et les muqueuses^{11,12}. Le diagnostic des mycoses invasives et des fongémies se fait en général sur un diagnostic non spécifique ou sur des techniques radiologiques. Des marqueurs biologiques d'infection fongique ont été récemment ajoutés aux méthodes diagnostiques actuellement disponibles².

Les organismes pathogènes fongiques opportunistes comprennent *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum*, et *Pneumocystis jirovecii*. Le (1→3)-β-D-glucane produit par ces organismes, et autres, peut être détecté par le test Fungitell®^{13,14}.

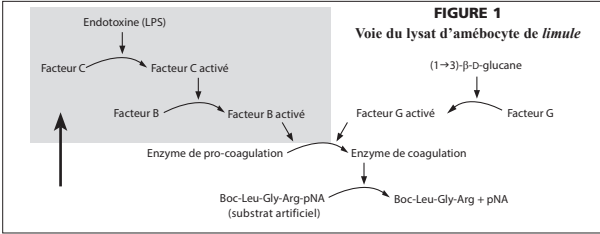
3. Principe de la Procédure

Le test Fungitell® mesure la quantité de (1→3)-β-D-glucane. Le test se base sur une modification de la voie du lysat d'améboocyte de *limule* (LAL)

Figure 1. Le réactif Fungitell® est modifié pour éliminer toute réactivité d'endotoxine bactérienne et, ainsi, pour réagir seulement avec le (1→3)-β-D-glucane, par le biais de la partie de la voie médiée par le facteur G. Le (1→3)-β-D-glucane active le facteur G, un zymogène de sérine protéase. Le facteur G activé transforme l'enzyme pro-coagulante inactive en une enzyme coagulante active, qui à son tour coupe la para-nitroaniline (pNA) du substrat peptidique chromogène, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, créant un chromophore, para-nitroaniline, qui absorbe à 405nm. L'étude cinétique du Fungitell®, décrite ci-dessous, se base sur la détermination du taux d'augmentation de la densité optique produite par un échantillon. Ce taux est interprété en fonction d'une courbe d'étalonnage produisant des estimations de concentration de (1→3)-β-D-glucane dans l'échantillon.

4. Matériel fourni avec le kit Fungitell®

Le kit Fungitell® est destiné à être utilisé pour le diagnostic in vitro. Les matériaux suivants fournis avec chaque kit suffisent pour tester 110 puits sur deux plaques de microtitration (55 puits chacune) :



- Le réactif Fungitell®, un LAL spécifique au (1→3)-β-D-glucane lyophilisé (deux flacons). *Le réactif Fungitell® se compose de lysat d'améboocyte de limule, et de substrat colorimétrique Boc-Leu-Gly-Arg-pNA. Il ne contient pas de protéines humaines ou mammifères.*
- Tampon de reconstitution Pyrosol®* (deux flacons). D'autres flacons de tampon de reconstitution Pyrosol (n° de catalogue BC051) peuvent être achetés séparément. Il est composé de *tampon Tris de 0,2 M*.
- Étalon de glucane, (1→3)-β-D-glucane lyophilisé de Pachyman (deux flacons). *Le volume d'eau de réactif à ajouter est indiqué sur l'étiquette du flacon. Il est étalonné par rapport à l'étalon de référence interne.*
- Eau de réactif LAL (LRW) (deux flacons)
- Remarque :** 20 ml de Reagent Grade Water (RGW) et de LRW dans des flacons en verre sont équivalents.
- Solution alcaline de prétraitement (deux flacons) qui contient *du KOH à 0,125 M et du KCl de 0,6 M*

Tous ceux-ci sauf l'étalon, ne contiennent pas de niveaux de (1→3)-β-D-glucane susceptibles d'interférer.

5. Matériaux nécessaires mais non fournis

- Tous les matériaux ne doivent pas interférer avec le glucane.
- Embouts de pipette* (250 µl - n° de catalogue PPT25, 1000 µl - n° de catalogue PPT10)
 - Des pipettes pouvant fournir des volumes de 5-25 µl et 100-1000 µl
 - Une pipette à répétition avec embouts de seringue pouvant fournir 100 µl
 - Des tubes à essai* pour la préparation des séries d'étalons (courbe de calibrage) et la combinaison des réactifs de traitement du sérum. (12 x 75 mm - n° de catalogue TB240 ou 13 x 100 mm - n° de catalogue TB013)
 - Lecteur de plaque d'incubation (37 °C) capable de lire à 405 nm (de préférence capable d'all surveillance à double longueur d'ondes à 405 et 490 nm) avec une plage dynamique allant jusqu'à 2.0 unités d'absorbance au moins, couplé avec un logiciel informatique approprié de test cinétique.
 - Tubes stériles exempts de glucane pour l'aliquotage des échantillons. Des tubes certifiés sans RNase, DNase et pyrogène peuvent être utilisés.
 - Parafilm®
 - Microplaques* à 96 puits **Remarque :** le test Fungitell® a été validé avec des plaques présentant les caractéristiques suivantes : en polystyrène, stériles, non revêtues, à fond plat, sans bêta-glucane interférent (selon les spécifications d'ACC) et emballées séparément.

* Ces produits, fournis par Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), sont certifiés sans glucanes interférents.

6. Stockage des réactifs

- Stocker tous les réactifs, tels que fournis, entre 2 et 8 °C à l'abri de la lumière.
- Le réactif reconstitué Fungitell® doit être stocké entre 2 et 8 °C et être utilisé dans 2 heures qui suivent. Le réactif reconstitué Fungitell® peut également être congelé à -20 °C pendant au plus 20 jours et utilisé après décongélation.

7. Mises en garde et précautions

- Ne pas pipeter à la bouche. Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit, sont manipulés.
- Respecter les consignes de sécurité opérationnelles et locales.
- Porter des gants de protection lors de la manipulation d'échantillons biologiques qui peuvent être infectieux ou dangereux. Les mains gantées doivent être considérées contaminées en tout temps ; tenir les mains gantées éloignées des yeux, de la bouche et du nez. Porter des lunettes de protection et un masque chirurgical s'il y a une possibilité de contamination par l'aérosol.
- Remarque :** Ne pas utiliser des kits dont le contenu est endommagé.
- Élimination : Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est régie par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités ou les entreprises de gestion des déchets locales pour obtenir des conseils pour l'élimination des déchets dangereux.
- Les fiches de données de sécurité** pour tous les composants du kit Fungitell® peuvent être téléchargés depuis le site d'ACC : www.acciusa.com.

7.1 Précautions procédurales

- Le test Fungitell® nécessite qu'une attention rigoureuse soit portée à l'environnement et à la technique du test. Une formation complète du technicien à la méthode de dosage et à éviter la contamination est essentielle pour l'efficacité du test.
- Utiliser les bonnes pratiques de laboratoire conformément aux réglementations locales. Ce test est sensible à la contamination et au pipetage inexact.
- Créer un environnement propre pour réaliser le test.
- Notez que toute contamination par des particules de glucane ou fongiques issues du corps humain, des vêtements, des contenants, de l'eau et des poussières en suspension dans l'air, pourrait interférer avec le test Fungitell®.
- Sources de contamination possibles : les matériaux contenant de la cellulose tels que la gaze, les serviettes en papier et le carton, les pipettes en verre avec bouchons en coton et

les embouts de pipette avec filtres en cellulose. La gaze et les éponges chirurgicales peuvent également libérer des quantités élevées de (1→3)-β-D-glucane^{21,22}. Pour d'autres sources de contamination liées au patient, voir la section Limites du test.

- Ne pas utiliser des matériaux après leur date d'expiration.

7.2 Manipulation des échantillons

- Le prélèvement et la préparation du sérum doivent être effectués conformément aux réglementations locales en vigueur. Collecte des échantillons : Les échantillons de sang peuvent être recueillis dans des tubes stériles de préparation de sérum ou dans des tubes séparateurs de sérum (SST) pour la préparation du sérum.
- Conservation des échantillons : Les échantillons de sérum peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 15 jours maximum, ou être congelés à -20 °C pendant 27 jours maximum ou à -80 °C pendant 4 ans maximum.
- Étiquetage des échantillons : Les échantillons doivent être clairement identifiés conformément aux bonnes pratiques de l'institution.

8. Procédure

8.1 Réglage de l'instrument et programmation du test

Les paramètres pourraient varier selon les instruments et les logiciels. En général, ce qui suit s'applique : Configurez le logiciel du lecteur de plaque pour recueillir les données en mode Vmean. Consultez le manuel du logiciel pour les paramètres appropriés afin de vous assurer que la valeur calculée est le taux moyen de changement de la densité optique pour tous les points de données recueillis. Réglez l'intervalle de lecture du détecteur au minimum autorisé par le logiciel ou l'instrument durant les 40 minutes du test. Les réglages de la longueur d'ondes du logiciel devraient être à 405 nm moins le fond à 490 nm. Il est recommandé d'utiliser les deux longueurs d'onde, mais si la lecture à double longueur d'onde n'est pas disponible, lisez le test à 405 nm et examinez chaque courbe cinétique de l'échantillon du patient pour détecter les signes d'interférence (voir section 9.0 pour plus de détails). La température d'incubation doit être à 37 °C. Configurez de sorte à commencer le mélange ou l'agitation de la plaque 5 à 10 secondes avant le début de la lecture. Sélectionnez « linéaire » ou l'équivalent pour l'ajustement du paramétrage de la courbe. La lecture devrait commencer sans décalage.

8.2 Préparation du glucane étalon fourni dans le kit.

- Dissolvez un flacon de glucane étalon avec le volume de LRW indiqué sur le flacon, pour obtenir une solution de 100 pg/ml. Agitez au vortex pendant au moins 30 secondes avec une vitesse moyenne ou moyenne-élevée pour reconstituer l'étalon (solution 1). La solution de glucane doit être conservée entre 2 et 8 °C et utilisée dans les trois jours. Les étapes b à e ci-dessous donnent un exemple de préparation de schéma d'une courbe d'étalonnage.
- Préparez une solution étalon de 50 pg/ml (solution 2) en mélangeant 500 µl de LRW et 500 µl de solution 1 dans un tube sans glucane (solution 2). Faire tourbillonner pendant au moins 10 secondes.
- Préparez une solution étalon de 25 pg/ml (solution 3) en mélangeant 500 µl de LRW et 500 µl de solution 2 dans un tube sans glucane (solution 3). Faire tourbillonner pendant au moins 10 secondes.
- Préparez une solution étalon de 12,5 pg/ml (solution 4) en mélangeant 500 µl de LRW et 500 µl de solution 3 dans un tube sans glucane (solution 4). Faire tourbillonner pendant au moins 10 secondes.
- Préparez une solution étalon de 6,25 pg/ml (solution 5) en mélangeant 500 µl de LRW et 500 µl de solution 4 dans un tube sans glucane (solution 5). Faire tourbillonner pendant au moins 10 secondes.

8.3 Ouvrez la solution alcaline de prétraitement.

La solution alcaline de prétraitement convertit les glucanes à triple hélice en glucanes monocaténaires^{17,18} qui sont plus réactifs dans le test. En outre, le pH alcalin sert à inactiver les inhibiteurs et les protéases sériques susceptibles d'interférer avec le test⁴

Jeter le tube (en respectant les procédures du laboratoire) sauf s'il doit être utilisé dans un test subséquent; dans ce cas, le recouvrir avec du Parafilm, en utilisant le côté qui est face au support papier.

8.4 Configuration de la plaque de microtitration

Configurez la disposition de la plaque de microtitration dans le logiciel avec les étalons (Std), les contrôles négatifs (Neg) et 21 échantillons (Spl). La disposition suivante est recommandée :

	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		Nég	Nég		SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21	
H												

Entrez les concentrations des étalons dans les paramètres du logiciel respectivement, 500, 250, 125, 62,5 et 31 pg/ml.

Notez que les concentrations des étalons entrées sont cinq fois plus élevées que celles préparées à la section 8.2 ci-dessus. Cela est dû au fait que le volume d'étalon utilisé dans le test est de 25 µl par puits, soit cinq fois le volume de l'échantillon de sérum utilisé (voir la section 8.5 b. ci-dessous). Ainsi, l'échantillon de sérum est effectivement dilué cinq fois par rapport à l'étalon. La multiplication des concentrations des étalons par cinq compense cette dilution.

Remarque : Les puits extérieurs peuvent être utilisés, s'il a été prouvé que leur efficacité équivaut à celle des puits internes.

Remarque : Les contrôles négatifs ne sont pas utilisés dans la courbe d'étalonnage.

8.5 Ajout de sérum et de solution alcaline de prétraitement.

- Décongelez les échantillons de sérum congelés à température ambiante. Bien mélangez tous les échantillons en tourbillonnant pendant au moins 30 secondes à vitesse moyenne et moyenne haute.
- Transférez 5 µl de l'échantillon de sérum dans chacun des puits indiqués (Uk, inconnus) au moins en double. Répétez l'opération pour chaque échantillon de sérum.
- Ajoutez 20 µl de la solution alcaline de prétraitement dans chaque puits contenant du sérum. Assurez-vous que le sérum et les gouttelettes de prétraitement soient en contact les uns avec les autres.

Remarque : Les étapes b et c peuvent être réalisées dans l'ordre inverse selon la préférence du technicien.

Remarque : Pour éviter une contamination accidentelle, retirez le couvercle sur la microplaque après avoir ajouté les échantillons et les réactifs dans les puits.
- Agitez la plaque pendant 5 à 10 secondes afin de mélanger le contenu des puits (vous pouvez utiliser la fonction agitation du lecteur de plaque) puis incubez pendant 10 minutes à 37 °C dans le lecteur de la plaque d'incubation.

8.6 Reconstitution du réactif Fungitell®.

Remarque : Cela pourrait être réalisé pendant que l'incubation de prétraitement est en cours. La cohérence du temps de reconstitution améliorera la reproductibilité puisque la réaction du Fungitell® commence après la reconstitution, même si c'est à un faible niveau.

Reconstituez un flacon de réactif Fungitell® en ajoutant 2,8 ml de LRW, puis 2,8 ml de tampon de reconstitution Pyrosol en utilisant la pipette de 1 000 µl. Couvrez le tube avec du Parafilm en utilisant le côté qui est face au support papier. Tournez doucement le tube pour faire dissoudre complètement. Ne pas faire tourbillonner.

8.7 Ajout de contrôles négatifs et des étalons de glucane.

- À la fin de l'incubation du prétraitement du sérum (étape 8.5 d.), retirez la plaque du lecteur de plaque d'incubation et ajoutez les étalons et les contrôles négatifs à la plaque. Modèle de concentration d'étalon recommandée :
- Ajoutez 25 µl de LRW aux puits G2 et G3.
 - Ajoutez 25 µl de la solution étalon 5 de 6,25 pg/ml aux puits F2 et F3, étiquetés comme étant de 31,25 pg/ml.
 - Ajoutez 25 µl de la solution étalon 4 de 12,5 pg/ml aux puits E2 et E3, étiquetés comme étant de 62,5 pg/ml.
 - Ajoutez 25 µl de la solution étalon 3 de 25 pg/ml aux puits D2 et D3, étiquetés comme étant de 125 pg/ml.
 - Ajoutez 25 µl de la solution étalon 2 de 50 pg/ml aux puits C2 et C3, étiquetés comme étant de 250 pg/ml.
 - Ajoutez 25 µl de la solution étalon 1 de 100 pg/ml aux puits B2 et B3, étiquetés comme étant de 500 pg/ml.

8.8 Ajout du réactif Fungitell® et procédure d'incubation de la plaque.

- Ajoutez 100 µl de réactif Fungitell® à chaque puits (contenant des contrôles négatifs, des étalons et des échantillons) en utilisant la pipette à répétition.
- Insérez la plaque dans le lecteur de microplaque (équilibré à 37 °C), retirez le couvercle et agitez pendant 5 – 10 secondes.

Lisez la plaque **sans le couvercle** à 405 nm moins 490 nm, pendant 40 minutes à 37 °C. *Remarque :* Si l'instrument ne laisse pas le temps d'enlever le couvercle entre l'agitation et la lecture, agitez sans le couvercle pour garantir une lecture sans couvercle.

9. Calculer les résultats.

Recueillez et analysez les données de la manière suivante : Examinez les graphiques cinétiques des échantillons testés et cherchez des tendances autres qu'une augmentation régulière comparable à celle des étalons. Des tracés invalides indiquant une interférence optique (ex: leurs schémas cinétiques ne correspondent pas à ceux des étalons). Calculez le taux moyen de changement de la densité optique (milli-unités d'absorbance par minute) pour tous les points entre 0 et 40 minutes (réalisé par le logiciel). Interpolez les concentrations de l'échantillon en (1→3)-β-D-glucane à partir de la courbe d'étalonnage (réalisée par le logiciel).

10. Contrôle qualité

- Le coefficient de corrélation (r) de la courbe d'étalonnage (linéaire vs linéaire) devrait être ≥ 0,980.
- Les puits avec 25 µl de LRW sont les contrôles négatifs. Les contrôles négatifs doivent avoir des valeurs de taux (par exemple milli-unités d'absorbance par minute) inférieures à 50 % des taux du plus faible étalon. Si ce n'est pas le cas, le test devrait être répété avec de nouveaux réactifs.
- Manipulation d'échantillons complexes. Si l'analyste observe une cinétique inhabituelle dans le test d'un échantillon, par exemple un échantillon trouble ou de couleur inhabituelle (comme ceux fortement hémolysés, lipémiques ou contenant un excès de bilirubine), l'échantillon doit être dilué avec de la LRW et testé de nouveau. La dilution doit être comptabilisée dans le rapport des résultats en multipliant le résultat par le facteur de

dilution. **Le facteur de dilution est généralement entré dans la configuration du logiciel pour l'échantillon et la correction est appliquée de manière automatique.**

Remarque:

- Tout utilisateur du test doit établir un programme de contrôle qualité pour s’assurer que le test soit effectué de manière compétente, dans le respect de la réglementation applicable dans sa localité.
- Il est recommandé de tester des échantillons sériques de contrôle (négatifs, proches de la valeur limite ou fortement positifs) dans le cadre de vérifications supplémentaires du laboratoire et des bonnes pratiques de laboratoire. Ceux-ci ne sont pas inclus dans le kit Fungitell®.

11. Interprétation des résultats

Résultat négatif

Les valeurs de (1→3)-β-D-glucane <60 pg/ml sont interprétées comme des résultats négatifs.

Le laboratoire qui effectue le test doit informer le médecin demandeur que toutes les infections fongiques n’entraînent pas des taux élevés de sérum (1→3)-β-D-glucane. Certains champignons, du genre *Cryptococcus*4, produisent un taux très faible de (1→3)-β-D-glucane. Les *Mucorales*, tel que l’*absidia*, *le mucor* et *le rhizopus*^{1,4} ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-glucane. De même, *Blastomyces dermatitidis*, dans sa phase de levure, produit très peu de (1→3)-β-D-glucane, et les patients souffrant de blastomycose ont des niveaux de (1→3)-β-D-glucane indétectables par le test Fungitell®.

Résultat indéterminé

Les valeurs comprises entre 60 et 79 pg/ml sont considérées comme non concluanes.

Des prélèvements et des analyses supplémentaires de sérum sont recommandés.

Des prélèvements et des analyses fréquents sont une meilleure aide au diagnostic.

Résultat positif

Des valeurs de (1→3)-β-D-glucane ≥ 80 pg/ml sont interprétées comme un résultat positif. Un résultat positif n’indique pas la présence d’une maladie et doit être utilisé en conjonction avec d’autres bilans cliniques pour établir un diagnostic.

12. Les limites du test

- L’emplacement des tissus dans une infection fongique⁶, l’encapsulation, et la quantité de (1→3)-β-D-glucane produite par certains champignons pourraient affecter la concentration sérique de cet analyte. La capacité réduite du (1→3)-β-D-glucane à contribuer à la circulation sanguine peut réduire la capacité à détecter certaines infections fongiques.
- Certaines personnes ont un taux élevé de (1→3)-β-D-glucane qui tombe dans la zone indéterminée. Dans ces cas, des tests de surveillance supplémentaires sont recommandés.
- La fréquence des tests dépendra du risque relatif d’infection fongique qu’encourt le patient. Des taux d’échantillonnage d’au moins deux à trois fois par semaine sont recommandés pour les patients à risque.
- Des résultats positifs ont été observés chez les patients hémodialysés^{20,28}, chez les sujets traités avec certains produits sanguins fractionnés tels que l’albumine de sérum et les immunoglobulines^{23,25} et dans les échantillons ou chez les sujets exposés à de la gaze et aux éponges chirurgicales contenant du glucane. Il faut 3 à 4 jours aux patients pour retrouver le niveau de base du sérum en (1→3)-β-D-glucane, après une exposition chirurgicale à des éponges et à des gazes contenant du (1→3)-β-D-glucane^{12,22}. En conséquence, il faudrait prendre en compte cela dans le choix du moment pour l’échantillonnage des patients opérés.
- Les échantillons prélevés au talon ou au doigt sont inacceptables, car il a été prouvé que le gaze imbibé d’alcool et utilisé pour préparer le site (et, potentiellement, le pool sanguin de la surface de la peau) contamine les spécimens. A ce jour les études n’ont observé aucune différence entre les échantillons obtenus par tirage aux traits ou par ponction veineuse^{6,27}.
- Pour un examen complet des facteurs contribuant aux faux positifs du (1→3)-β-D-glucane, voir Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)⁹.
- Les niveaux de test ont été établis chez des sujets adultes. Les niveaux normaux et de seuil pour les enfants en bas âge et les enfants plus âgés sont à l’étude^{28,29}.

13. Caractéristiques de performance

13.1 Valeurs seuils et valeurs attendues

Une étude prospective multicentrique³¹ menée afin de déterminer la sensibilité et la spécificité diagnostiques du test Fungitell® (voir les tests comparatifs ci-dessous) a montré que les valeurs de bêta-glucane sont élevées dans une variété d’infections fongiques. Lorsque les signes et les symptômes sont présents à un taux de 80 pg/ml ou plus, la valeur prédictive selon laquelle le sujet est positif pour une infection fongique varie entre 74,4 et 91,7 %. En l’absence de signes et de symptômes à moins de 60 pg/ml, la valeur prédictive négative varie entre 65,1 % et 85,1 %.

13.2 Performances cliniques

Une étude prospective multicentrique pour valider les caractéristiques de performance du test Fungitell® a été réalisée³¹. Le test a été comparé à d’autres méthodes de détection standards, (ex: hémoculture, examen histopathologique de biopsie et de radiographie) de mycoses et de fongémies.

Le test a été utilisé sur trois cent cinquante-neuf (359) sujets. Un échantillon unique a été obtenu pour chaque sujet. Les sujets à faible risque comprenaient des personnes apparemment en bonne santé et celles sur les sites cliniques étaient hospitalisées pour des raisons autres que des infections fongiques. Une accumulation de sujets a été faite sur six sites cliniques aux États-Unis. Quatre sites cliniques ont effectué le test sur un total de 285 échantillons. ACC a testé deux fois tous les 359 échantillons mais n’a utilisé que la deuxième série de résultats pour déterminer les performances du test. Les résultats de la seconde série d’analyses n’étaient pas statistiquement différents de la première série.

• **Sensibilité du diagnostic**

La sensibilité pour toute la population de sujets (359) y compris les patients atteints de la cryptococcose était de 65,0 % [intervalle de confiance (IC) à 95 % de 60,1 - 70,0 %] (Tableau 1).

• **Spécificité du diagnostic**

La spécificité était de 81,1 % (IC de 77,1 - 85,2 %). Lors de l’analyse des 170 sujets négatifs pour une infection fongique et des individus apparemment sains, la spécificité était de 86,5 % avec le test (IC de 82,8 % - 90,1 %). Une spécificité de 81,1 % (IC de 77,1 - 85,2 %) a été observée lorsque les 26 sujets testés négatifs à une infection fongique, mais ayant d’autres troubles, ont été rajoutés.

Tableau 1 Résultats du test ACC à un seuil de 60-80 pg/ml par site								
Site	Sensibilité prouvée/probable ≥ 80 pg/ml			Spécificité < 60 pg/ml			Équivoque 60<X<80	Total
	Pos/Clin. Pos	Sensibilité	Valeur Prédictive Positive	Nég/Clin. Nég	Spécificité	Valeur Prédictive Négative		
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	Ne s’applique pas	0/0	Ne s’applique pas	0,0	0	1
Total	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Lorsque l’on compare les résultats obtenus par ACC (359 échantillons) et par les sites cliniques (285 échantillons) au diagnostic clinique, la sensibilité est de 64,3 % (IC de 58,8 % - 69,9 %) pour ACC et de 61,5 % (IC de 55,9 % - 67,2 %) pour les sites. La spécificité est de 86,6 % (IC de 82,7 % - 90,6 %) pour ACC contre 79,6 % (IC de 74,9 % - 84,3 %) pour les sites

Candidose

Dans cette étude prospective, 107 sujets ont reçu un diagnostic positif de candidose. 83 de ces 107 sujets étaient positifs selon le test Fungitell®.

Cent soixante-quinze échantillons de la bibliothèque de candidose ont été fournis à Associates of Cape Cod, Inc. 145 des 175 se sont avérés positifs lors du test.

Aspergillose

Au total, 10 sujets étaient positifs pour l’aspergillose. 8 des 10 étaient positifs selon le test.

Fusariose

Trois sujets étaient positifs pour la fusariose. 2 des 3 étaient positifs selon le test.

Traitement médicamenteux antifongique

La présence ou l’absence de traitement médicamenteux antifongique n’a pas eu d’effet statistiquement significatif sur la sensibilité du test. 118 sujets se sont révélés positifs pour une infection fongique invasive et sous traitement antifongique. 82 étaient positifs selon le test (sensibilité, 69,5 % ; IC de 61,2 % - 77,8 %). En outre, vingt-quatre (24) sujets se sont révélés positifs, mais ne suivaien aucun traitement antifongique. 18 étaient positifs selon le test (sensibilité, 75 % ; IC de 57,7 % - 92,3 %).

13.3 Corrélations du test

Quatre sites cliniques ont testé un total de 285 échantillons. Les résultats du test sur le site ont quantitativement corrélés à 96,4 % avec les résultats chez Associates of Cape Cod, Inc. Les corrélations d’Associates of Cape Cod, Inc. avec les différents sites de test varient entre 90,6 et 99,2%.

13.4 Précision

Le test Fungitell® a été évalué en termes de précision (c’est-à-dire de répétabilité et de reproductibilité) à l’aide de dix (10) échantillons différents, testés chacun par trois sites de test, trois jours différents. La variation intra-test allait de 0,9 % à 28,9 % et a servi de mesure de répétabilité. La variation inter-test allait de 3,9 % à 23,8 % et a servi de mesure de reproductibilité. Les quatre (4) échantillons négatifs ont été exclus des deux analyses.

13.5 Plage de mesure et linéarité

Les résultats sont exprimés en pg/ml de sérum et varient de non-détectable (<31 pg/ml) à >500 pg/ml. Ils sont imprimés ou lus par le logiciel à partir de la courbe d’étalonnage. Des valeurs précises au-delà de 500 pg/ml nécessitent que l’échantillon soit dilué avec l’eau de réactif LAL et testé de nouveau. Comme indiqué dans la section Contrôle qualité, le coefficient de corrélation (r) de la courbe d’étalonnage (linéaire vs linéaire) couvrant la plage de mesure du test Fungitell® doit être ≥ 0,980 et les contrôles négatifs doivent avoir des valeurs de taux (par exemple, milli-unités/d’absorbance par minute) inférieures à 50 % du taux de l’étalon le plus faible. Si ce n’est pas le cas, le test devrait être répété avec de nouveaux réactifs.

13.6 Substances Interférantes

Les conditions d’échantillon suivantes peuvent interférer avec un résultat de test Fungitell® précis :














- Les échantillons de couleurs non attendues ou troubles, par exemple, ceux qui sont fortement hémolysés, lipémiques, ou qui contiennent un excès de bilirubine pourraient créer une interférence optique avec le test. Si de tels échantillons sont

- testés, les résultats du test devraient être examinés à la recherche de preuves d’interférences optiques et de schémas cinétiques inhabituels.
- Un taux élevé d’immunoglobuline G, tel qu’il pourrait exister dans le sérum à cause d’un myélome multiple, pourrait entraîner une précipitation dans le mélange réactionnel après l’ajout du Fungitell® au sérum prétraité³⁰.
- Au moment de la réaction de la présente, aucune substance activant le facteur G (élément de détection du (1→3)-β-glucane) du réactif Fungitell® autre que le (1→3)-β-glucane n’a été décrite. Dans certaines études, où des affirmations de réactivité croisée ont été faites, le traitement de la substance d’activation supposée avec de la (1→3)-β-glucanase purifiée a éliminé le signal, démontrant que l’activation observée était due à une contamination par du (1→3)-β-glucane³¹. Une contamination par de la sérine protéase peut également entraîner la libération de para-nitroaniline dans les mélanges réactionnels du Fungitell®, mais ceux-ci sont inactifs dans le cadre du processus de prétraitement.

14. Méta-Analyses

En outre, de nombreuses études évaluées par des pairs ont été publiées au sujet de l’apport du (1→3)-β-D-glucane sérique au diagnostic des infections fongiques invasives, y compris les méta-analyses de la performance diagnostique^{32,34,35,36,37}.

15. Légende des symboles

	« Utilisé le »		« Consulter le mode d’emploi »
	« Contenu suffisant pour ‘N’ tests »		« Représentant autorisé »
	« Code de lot »		« Marque CE »
	« Dispositif médical pour diagnostic in vitro »		« Uniquement sur ordonnance »
	« N° de catalogue »		« Mise en garde »
	« Limitation de température »		« Tenir à l’abri de la lumière »
	« Fabricant »		

16. Représentants autorisés

 Emergo Europe
Prinsessegracht 20, 2514 AP, The Hague, Pays-Bas

Sponsor australien : Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Australie

Remarque : Tout incident grave survenu en rapport avec le dispositif doit être signalé au fabricant et à l’autorité compétente de l’État membre dans lequel l’utilisateur et/ou le patient sont établis.

17. Coordonnées

Siège social

Associates of Cape Cod, Inc.

124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536-4445, États-Unis
Tél. : (888) 395-2221 ou (508) 540-3444 • Fax : +1 (508) 540-8680
E-mail : custservice@acciusa.com • www.acciusa.com

Royaume-Uni

Associates of Cape Cod Int’l, Inc.

Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Royaume-Uni
Tél. : (44) 151-547-7444 • Fax : (+44) 151-547-7400
E-mail : info@acciuk.co.uk • www.acciuk.co.uk

Europe

Associates of Cape Cod Europe GmbH

Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Allemagne
Tél. : (+49) 61 05-96 10 0

18. Historique des révisions

Rév. 0 à 11 : Changement de test en triple exemplaire à test en double exemplaire. Remplacement de l’eau de gade réactif par l’eau de réactif LAL. Combinaison des composants KCL et KOH dans la solution alcaline de prétraitement. Retrait de la microplaque du kit qui devient un article requis mais non fourni. Changement du mandataire européen et ajout d’ un sponsor australien. Clarifications mineures, mise en forme, ajout de symboles, ajout de substances interférentes.

19. Références

- 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.
- 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) Consensus Group. Clin. Inf. Dis. 46:1813-1821.
- 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.
- Binder, U., Maurer, E., and Lass-Flörl, C. 2014. Mucormycosis – from the pathogens to the disease. Lin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl.6): 60-66.
- 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.
- 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. Livintseva, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grunich, D.E., Kerkerung, 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 hemolymp 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* ameobocyte 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. Evaluation 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., Iden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakata, Y., and Kaki, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauge types. Tokohu J. Exp. Med. 217: 117-121.

22. Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Coenanour, 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., Koemanova, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, L., 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. Posterao B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi,M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguineti, 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-glucon 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 Maternal-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 Waldenström’s macroglobulinemia. J.Clin. Microbiol. 50:1054-6.

31. Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, P., 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. Karaeorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis Pl, 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 A I, 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.

36. Karaeorgopoulos DE, Qu JM, Korblia IP, Zhu YG, Vasileiou FA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39-49.