

Test oceniający stężenie (1→3)-β-D-glukanu w surowicy

TEST FUNGITELL®

Instrukcja stosowania



**ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED**

124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02556 USA

Telefon: (508) 540-3444
 Telefon bezpłatny: (888) 395-2221
 Faks: (508) 540-8680
 Obsługa techniczna: (800) 848-3248
 Obsługa klienta: (800) 525-8378

PN001268-pl Wer. 11

REF F1001

2021-12-14


K_{only}

IVD

Σ

42

CE

 Aby pobrać instrukcję stosowania w innej wersji językowej, należy odwiedzić witrynę internetową www.acciusa.com.

Ten produkt jest przeznaczony wyłącznie do diagnostyki in vitro i profesjonalnego użytku.

1. Przeznaczenie

Test **Fungitell**® to test kolorymetryczny na bazie zymogenowej proteazy używany do jakościowego wykrywania (1→3)-β-D-glukanu w surowicy pacjentów z objawami lub stanami medycznymi predysponującymi do wystąpienia inwazyjnych infekcji grzybiczych. Wartości stężenia w surowicy (1→3)-β-D-glukanu, głównego komponentu ściany komórkowej różnych grzybów o istotnym znaczeniu medycznym¹, można wykorzystywać do pomocy w diagnozowaniu grzybic głębokich i fungemii². Wynik dodatni nie wskazuje rodzaju grzybów, które mogą być przyczyną infekcji.

Miano (1→3)-β-D-glukanu należy wykorzystywać w skojarzeniu z innymi procedurami diagnostycznymi, jako na przykład posiew mikrobiologiczny, badanie histologiczne próbek biopsyjnych oraz badanie radiologiczne.

Ważne

Należy przekazać te informacje lekarzowi zlecającemu: *Niektóre grzyby, jak na przykład należące do rodzaju Cryptococcus, które wytwarzają bardzo niskie stężenia (1→3)-β-D-glukanu, mogą nie podwyższyć stężenia (1→3)-β-D-glukanu w surowicy do poziomu wykrywanego przez test¹⁴. W przypadku badania próbek pochodzących od pacjentów zainfekowanych grzybami z rzędu Mucorales, jak Absidia, Mucor i Rhizopus¹⁴, które zgodnie z bieżącą wiedzą nie wytwarzają (1→3)-β-D-glukanu, również uzyskano niskie miano (1→3)-β-D-glukanu w surowicy. Ponadto Blastomyces dermatitidis w fazie drożdży wytwarza niskie ilości (1→3)-β-D-glukanu i w związku z tym może nie być wykrywany w teście¹⁴.*

Należy dołączyć to oświadczenie do raportowania wyników testu Fungitell®.

2. Podsumowanie i objaśnienia

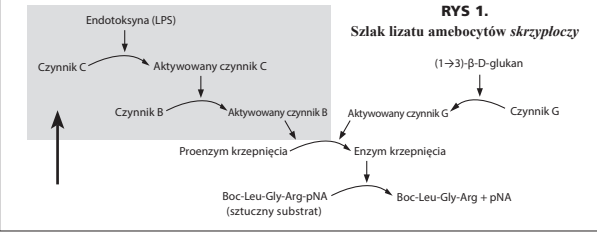
Mamy do czynienia z rosnącą częstością występowania infekcji grzybiczych powodowanych przez patogeny oportunistyczne, zwłaszcza u pacjentów z upośledzoną odpornością^{6,7,8}. Inwazyjne grzybyce, jako infekcje oportunistyczne, szczególnie często występują u pacjentów z hematologicznymi nowotworami złośliwymi i pacjentów z AIDS oraz stanowią rosnącą liczbę infekcji szpitalnych, zwłaszcza u pacjentów po przeszczepie narządu oraz u pacjentów przyjmujących leczenie immunosupresyjne^{9,10}. Wiele chorób grzybiczych nabywa się poprzez wdychanie przetrwalników grzybiczych pochodzących z gleby, detrytus u roślinnego, systemów klimatyzacji i (lub) odsłoniętych powierzchni. Niektóre grzyby oportunistyczne występują wewnątrz na ludzkiej skórze, układzie pokarmowym i błonach śluzowych^{11,12}. Rozpoznanie inwazyjnej grzybicy i fungemii na ogół opiera się o nieswoiste techniki diagnostyczne lub radiologiczne. Niedawno do dostępnych metod diagnostycznych dolożono markery biologiczne infekcji grzybiczej³.

Oportunistyczne patogeny grzybicze to m.in. *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* i *Pneumocystis jirovecii*. (1→3)-β-D-glukan wytwarzany przez te i inne mikroorganizmy można wykrywać za pomocą testu Fungitell^{18,13,14}.

3. Zasady procedury

Test Fungitell® określa stężenie (1→3)-β-D-glukanu. Test działa na zasadzie modyfikacji szlaku LAL (ang. *Limulus* Amebocyte Lysate (LAL), lizat amebocytów skrzyploczy).

Rys 1. Odczynnik Fungitell® zmodyfikowano w celu wyeliminowania reaktywności z endotoksynami bakteryjnymi, dzięki czemu wchodzi w reakcję wyłącznie z (1→3)-β-D-glukanem za pośrednictwem strony szlaku mediuowanej przez czynnik G. (1→3)-β-D-glukan aktywuje czynnik G, zymogenową proteazę seryny. Aktywowany czynnik G konwertuje nieaktywny proenzym krzepnięcia do aktywnego enzymu krzepnięcia, co z kolei rozszczepia para-nitroanilid (pNA) z peptydowego substratu chromogennego, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, tworząc chromofór, para-nitroanilinę, która pochłania fale o długości 405 nm. Opisany poniżej test kinetyczny Fungitell® bazuje na określeniu prędkości wzrostu gęstości optycznej w danej próbce. Tę częstość interpretuje się, porównując ją z krzywą wzorcową w celu oszacowania stężenia (1→3)-β-D-glukanu w próbce.



4. Materiały dostarczane z zestawem Fungitell®

Zestaw Fungitell® jest przeznaczony do stosowania w diagnostyce in vitro. Poniższe materiały dostarczane w każdym zestawie wystarczają do analizy 110 studzienek w dwóch płytках mikrotitracyjnych (po 55 studzienek w każdej płytce).

- Odczynnik Fungitell®, liofilizowany LAL swoisty względem (1→3)-β-D-glukanu (dwie fiołki).
- Odczynnik Fungitell® składa się z lizatu amebocytów skrzyploczy (tj. kraka podkowiastego) i substratu kolorymetrycznego *Boc-Leu-Gly-Arg-pNA*. Test nie zawiera białek ludzkich ani ssaków.
- Bufor rekonstytucyjny Pyrosol® (dwie fiołki). Dodatkowe fiołki buforu rekonstytucyjny Pyrosol® (numer katalogowy BC051) można nabyć oddzielnie. *Sklada się on z 0,2 M buforu Tris.*
- Wzorzec glukanu, liofilizowany (1→3)-β-D-glukan z pachymanu (dwie fiołki). *Objętość wody odczynnikowej do dodania podano na etykiecie fiołki. Jest on kalibrowany względem wewnętrznego wzorca referencyjnego.*
- Woda odczynnikowa LAL (LRW) (dwie butelki)
- Uwaga: 20 mL wody oczyszczonej (RGW) i woda LRW w szklanych fiołkach są równoważne.
- Zasadowy roztwór obróbki wstępnej (dwie fiołki) zawierający *0,125 M KOH i 0,6 M KCl*

Wszystkie powyższe odczynniki, z wyjątkiem wzorca, nie zawierają (1→3)-β-D-glukanu w stężeniu mogącym powodować interferencję.

5. Materiały wymagane, lecz nie dostarczane

- Wszystkie materiały muszą być wolne od glukanu w stężeniu mogącym powodować interferencję.
- Końcówki pipet* (250 µL — nr kat. PPT25, 1000 µL — nr kat. PPT10)
 - Pipety o możliwości dozowania 5–25 µL oraz 100–1000 µL
 - Pipeta automatyczna z końcówkami umożliwiającymi dozowanie 100 µL
 - Probkówki testowe* do przygotowywania standardowych serii (krzywa kalibracyjna) oraz łączenia odczynników obróbki surowicy. (12 × 75 mm — nr kat. TB240 lub 13 × 100 mm — nr kat. TB013)
 - Inkubujący (37 °C) czynnik płytek zdolny do odczytów fali o długości 405 nm (najlepiej zdolny do monitorowania fal o dwóch długościach: 405 i 490 nm) z zakresem dynamicznym równym co najmniej 2 jednostkom absorpcji połączony z odpowiednim komputerowym oprogramowaniem testu kinetycznego.
 - Sterylnie, niezawierające glukanów, próbki do podzielenia próbek na jednakowe części. Można stosować probkówki z atestem RNase, DNase i niezawierające pirogenów.
 - Parafilm*
 - Mikropłytki 96-studzienkowe* **Uwaga:** Test Fungitell® został poddany walidacji przy użyciu płytek o następujących właściwościach: polistrenowe, sterylne, nieopłaszczone, z płaskim dnem, bez interferującego betaglukanu zgodnie ze specyfikacją ACC oraz indywidualnie pakowane.

* Te produkty, dostarczane przez firmę Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), są certyfikowane na brak obecności glukanów w stężeniu powodującym interferencję.

6. Przechowywanie odczynników

- Wszystkie odczynniki należy przechowywać w dostarczonych opakowaniach, w ciemnym miejscu w temperaturze 2–8 °C.
- Poddany rekonstytucji odczynnik Fungitell® należy przechowywać w temperaturze 2–8 °C i użyć w ciągu 2 godzin. Ewentualnie poddany rekonstytucji odczynnik Fungitell® można zamrozić w temperaturze -20 °C na okres do 20 dni, a po rozmrożeniu wykorzystać.

7. ⚠️ OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

- Nie pipetować żadnych materiałów ustami. Nie palić, nie jeść i nie pić w obszarach, gdzie wykonywane są czynności na preparatach i odczynnikach zestawu.
- Przestrzegać operacyjnych i lokalnych przepisów dotyczących bezpieczeństwa.
- Podczas pracy z próbkami biologicznymi, które mogą być zakażone lub niebezpieczne, należy nosić rękawice ochronne. Dłonie w rękawicach należy uważać za skażone przez cały czas; nie zbliżać ich do oczu, ust ani nosa. W przypadku wystąpienia ryzyka aerozolem należy nosić okulary ochronne i maskę chirurgiczną.
- Uwaga:** Nie używać zestawów o uszkodzonej zawartości.
- Utylizacja: Pozostałości substancji chemicznych i preparatów są zazwyczaj uważane za odpady niebezpieczne. Utylizacja tego typu odpadów jest regulowana przepisami krajowymi i lokalnymi. Aby uzyskać wskazówki dotyczące usuwania odpadów niebezpiecznych, należy skontaktować się z lokalnymi władzami lub przedsiębiorstwami gospodarki odpadami.
- Karty charakterystyki substancji niebezpiecznej** dla wszystkich składników zestawu Fungitell® można pobrać ze strony internetowej ACC: www.acciusa.com.

7.1 Środki ostrożności podczas postępowania

Test Fungitell® wymaga przykładania dużej wagi do techniki oraz środowiska testowego. Ogromne znaczenie w skutecznym wykonywaniu testu ma dokładne przeszkolenie technika w zakresie tej metody oznaczania oraz unikania kontaminacji.

- Należy stosować dobre praktyki laboratoryjne zgodnie z lokalnymi przepisami. Ten test jest wrażliwy na zanieczyszczenie i niedokładność pipetowania.
- Utworzyć czyste środowisko, gdzie będzie wykonywany test.
- Należy pamiętać, że glukan oraz zanieczyszczenie grzybami pochodzącymi z ludzkiego ciała, odzieży, pojemników, wody oraz pyłów unoszących się w powietrzu może zakłócać działanie testu Fungitell®.

- Możliwe źródła zanieczyszczenia to materiały zawierające celulozę, takie jak gaza, papierowe ściereczki i karton, pipety szklane z bawelnianymi korkami i końcówki pipet z filtrami celulozowymi. Końcówki gazików chirurgicznych i gąbki mogą również wydzielać duże ilości (1→3)-β-D-glukanu^{11,12}. Informacje na temat innych źródeł skażenia związanych z pacjentem można znaleźć w punkcie „Ograniczenia”.
- Nie należy używać materiałów po upłynięciu ich terminu ważności.

7.2 Postępowanie z próbkami

- Pobieranie krwi i przygotowanie surowicy należy przeprowadzać zgodnie z obowiązującymi lokalnymi przepisami. Pobieranie próbek: Próbkki krwi można pobierać do sterylnych próbeków do przygotowywania surowicy lub próbeków rozdzielania surowicy (SST) używanych do przygotowywania surowicy.
- Przechowywanie próbek: Próbkki surowicy mogą być przechowywane w temperaturze 2–8 °C maksymalnie przez 15 dni lub zamrożone w temperaturze -20 °C maksymalnie przez 27 dni lub -80 °C przez okres do 4 lat.
- Oznakowanie próbek: Próbkki należy wyraźnie oznakować zgodnie z zatwierdzonymi praktykami danej instytucji.

8. Procedura

8.1 Ustawianie urządzenia i programowanie testu

Ustawienia mogą być inne w zależności od modelu i oprogramowania urządzeń. Na ogół zastosowanie mają poniższe informacje: Ustawić oprogramowanie czynnika płytek na gromadzenie danych w trybie Vmean. Sprawdzić instrukcję obsługi oprogramowania pod kątem odpowiednich ustawień, aby upewnić się, że wyliczona wartość jest średnią prędkością zmiany gęstości optycznej dla wszystkich zgromadzonych punktów danych. Ustawić interwał odczytu detektora na minimalną wartość dopuszczalną przez oprogramowanie/aparat w ciągu 40-minutowego okresu wykonywania testu. W oprogramowaniu należy ustawić długość fali na 405 nm minus promieniowanie tła o długości fali 490 nm. Zaleca się stosowanie obu długości fal, jednak jeśli nie ma możliwości prowadzenia odczytu przy dwóch długościach fal, test należy odczytać przy 405 nm, a następnie należy ocenić krzywą kinetyczną wszystkich próbek pacjentów pod kątem interferencji (więcej informacji można znaleźć w punkcie 9.0). Temperaturę inkubacji należy ustawić na 37 °C. Mieszanie/wytrząsanie płytki powinno mieć miejsce od 5 do 10 sekund przed rozpoczęciem odczytu. Wybrać opcję liniowego dopasowania krzywej (lub równoważne ustawienie). Odczyt powinien rozpocząć się bez opóźnienia.

8.2 Przygotowanie wzorca glukanu dostarczonego w zestawie.

- Rozpuścić jedną fiołkę wzorca glukanu, używając wody LRW w objętości podanej na fiołce w celu utworzenia roztworu o stężeniu 100 pg/mL. Worteksować co najmniej 30 sekund na średnich lub średnio-wysokich obrotach, aby przeprowadzić rekonstytucję wzorca (roztwór nr 1). Roztwór glukanu należy przechowywać w temperaturze 2–8 °C i wykorzystać w ciągu trzech dni. Poniższe punkty od b do e przedstawiają przykład sposobu przygotowania krzywej wzorcowej.
- Przygotować wzorzec o stężeniu 50 pg/mL (roztwór nr 2), mieszając 500 µL wody LRW i 500 µL roztworu nr 1 w probówce niezawierającej glukanu (roztwór nr 2). Worteksować przez co najmniej 10 sekund.
- Przygotować wzorzec o stężeniu 25 pg/mL (roztwór nr 3), mieszając 500 µL wody LRW i 500 µL roztworu nr 2 w probówce niezawierającej glukanu (roztwór nr 3). Worteksować przez co najmniej 10 sekund.
- Przygotować wzorzec o stężeniu 12,5 pg/mL (roztwór nr 4), mieszając 500 µL wody LRW i 500 µL roztworu nr 3 w probówce niezawierającej glukanu (roztwór nr 4). Worteksować przez co najmniej 10 sekund.
- Przygotować wzorzec o stężeniu 6,25 pg/mL (roztwór nr 5), mieszając 500 µL wody LRW i 500 µL roztworu nr 4 w probówce niezawierającej glukanu (roztwór nr 5). Worteksować przez co najmniej 10 sekund.

8.3 Otworzyć fiołkę zasadowego roztworu obróbki wstępnej.

Zasadowy roztwór obróbki wstępnej konwertuje glukany w formie potrójnej helisy w glukany jednokionowe^{15,16}, które wykazują większą reaktywność w teście. Ponadto zasadowe pH inaktywuje proteazy surowicy oraz inhibitory, które mogą zakłócać działanie testu.²⁴

Wyrzucić fiołkę (zgodnie z procedurami laboratoryjnymi), o ile nie będzie używana w kolejnym teście. W tym drugim przypadku należy ją zakryć parafilmem, używając strony, która była skierowana w stronę papieru.

8.4 Ustawienie płytki mikrotitracyjnej

Ustawić układ płytki mikrotitracyjnej w oprogramowaniu, ze wzorcami (Std), kontrolami ujemnymi (Neg) i 21 próbkami (Sp1). Zalecany jest następujący układ:

| | 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 | | Ujemne | Ujemne | | SPL3 | SPL6 | SPL9 | SPL12 | SPL15 | SPL18 | SPL21 | |
| H | | | | | | | | | | | | |

Wprowadzić do ustawień oprogramowania stężenia wzorca (odpowiednio 500, 250, 125, 62,5 i 31 pg/mL).

Należy pamiętać, że wprowadzane stężenia wzorca są pięciokrotnie większe od przygotowanych w powyższym punkcie 8.2. Wynika to z faktu, że objętość wzorca używana w teście to 25 µL na studzienkę, czyli jest pięciokrotnie większa od używanej objętości próbki surowicy (patrz poniższy punkt 8.5 b). W związku z tym próbka surowicy jest w rzeczywistości rozcieńczona pięciokrotnie względem wzorca. Pomnożenie stężeń wzorca przez pięć kompensuje to rozcieńczenie.

Uwaga: Można używać zewnętrznych studzienek. Wykazano, że wydajność testu przy używaniu zewnętrznych studzienek jest porównywalna z używaniem studzienek wewnętrznych.

Uwaga: Przy tworzeniu krzywej wzorcowej nie są używane kontrole ujemne.

8.5 Dodanie surowicy i zasadowego roztworu obróbki wstępnej.

- Rozmrozić zamrożone próbki surowicy w temperaturze pokojowej. Dobrze worteksować wszystkie próbki — przez co najmniej 30 sekund na średnich lub średnio-wysokich obrotach.
- Przenieść 5 µL próbki surowicy do każdej z wyznaczonych studzienek (Uk) co najmniej dwa razy. Powtórz tę czynność dla każdej próbki surowicy.
- Dodać do każdej studzienki z surowicą 20 µL zasadowego roztworu obróbki wstępnej. Dopilnować, aby krople surowicy oraz roztworu obróbki wstępnej zetknęły się ze sobą. Uwaga: Czynności z punktów b i c można wykonać w odwrotnej kolejności, w zależności od preferencji technika.
- Uwaga: Aby uniknąć przypadkowej kontaminacji, należy założyć pokrywę na mikropłytkę po dodaniu próbek i odczynników do studzienek.
- Przetraszać płytkę przez 5–10 sekund, aby wymieszać zawartość studzienek (można użyć funkcji wytrząsania czynnika płytek), a następnie inkubować płytkę przez 10 minut w temperaturze 37 °C przy użyciu inkubującego czynnika płytek.

8.6 Rekonstytucja odczynnika Fungitell®.

Uwaga: Tę czynność można wykonać w trakcie inkubacji obróbki wstępnej. Spójności czasu rekonstytucji zwiększyć odpowiadająco, ponieważ reakcja testu Fungitell® rozpoczyna się po rekonstytucji, chociaż na niskim poziomie.

Przeprowadzić rekonstytucję jednej fiołki odczynnika Fungitell®, dodając 2,8 mL wody LRW, a następnie 2,8 mL bufora rekonstytucyjny Pyrosol, używając do tego celu 1000 µL pipety. Zakryć fiołkę parafilmem, używając strony, która była skierowana w stronę papieru. Delikatnie wymieszać zawartość fiołki w celu zupełnego jej rozpuszczenia — nie worteksować.

8.7 Dodanie kontroli ujemnej oraz wzorców glukanu.

Po zakończeniu inkubacji roztworu obróbki wstępnej surowicy (punkt 8.5 d.) wyjąć płytkę z inkubującego czynnika płytek i dodać do płytki wzorce oraz kontrole ujemne. Zalecany schemat stężenia wzorca:

- Dodać 25 µL wody LRW do studzienki G2 i G3.
- Dodać 25 µL roztworu nr 5 wzorca o stężeniu 6,25 pg/mL do studzienki F2 i F3, oznaczonej jako 31,25 pg/mL.
- Dodać 25 µL roztworu nr 4 wzorca o stężeniu 12,5 pg/mL do studzienki E2 i E3, oznaczonej jako 62,5 pg/mL.
- Dodać 25 µL roztworu nr 3 wzorca o stężeniu 25 pg/mL do studzienki D2 i D3, oznaczonej jako 125 pg/mL.
- Dodać 25 µL roztworu nr 2 wzorca o stężeniu 50 pg/mL do studzienki C2 i C3, oznaczonej jako 250 pg/mL.
- Dodać 25 µL roztworu nr 1 wzorca o stężeniu 100 pg/mL do studzienki B2 i B3, oznaczonej jako 500 pg/mL.

8.8 Procedura dodawania odczynnika Fungitell® oraz inkubacji płytki.

- Dodać 100 µL odczynnika Fungitell® do każdej studzienki (z kontrolami ujemnymi, wzorcami i próbkami), używając pipety automatycznej.
- Włożyć płytkę do czynnika mikropylek (o temperaturze wyrównanej do 37 °C), zdjąć wieko i wytrząsać przez 5–10 sekund.

Przeprowadzić odczyt płytki **bez wieku** przy długości fali 405 nm minus 490 nm w czasie 40 minut, w temperaturze 37 °C. Uwaga: Jeżeli aparat nie daje możliwości zdjęcia wieku pomiędzy wytrząsaniem i odczytem, należy przeprowadzić wytrząsanie przy zdjętym wieku, aby zagwarantować odczyt bez wieku.

9. Obliczyć wyniki.

Zebrać i przeanalizować dane w poniższy sposób: Sprawdzić wykresy kinetyczne próbek testowych, szukając schematów innych niż płyny wzrost porównywalny do schematu wzorca. Unieważnij wykresy wykazujące cechy interferencji optycznej (kiedy przykładowo schematy kinetyczne nie pokrywają się ze schematami wzorca). Wyliczyć średnią prędkość zmiany gęstości optycznej (jednostki miliabsorbancji na minutę) dla wszystkich punktów w okresie od 0 do 40 minut (tę czynność wykonuje oprogramowanie). Interpolować stężenia (1→3)-β-D-glukanu z próbek, używając do tego celu krzywej wzorcowej (tę czynność wykonuje oprogramowanie).

10. Kontrola jakości

- Współczynnik korelacji (r) krzywej wzorcowej (liniowy vs liniowy) powinien wynosić $\geq 0,980$.
- Studzienki zawierające 25 µL wody LRW to kontrola ujemna. Wartości prędkości zmian (np. jednostki miliabsorbancji na minutę) dla kontroli ujemnych powinny wynosić mniej niż 50% prędkości dla najniższego wzorca. W przeciwnym wypadku należy powtórzyć test z wykorzystaniem nowych odczynników.
- Obsługa próbek złożonych. Jeśli analityk zaobserwuje niezwykłą kinetykę w teście próbk, np. próbk, która jest mętna, odbarwiona lub matowa (jak w przypadku próbek z nadmierną hemolizą, lipemią lub zbyt wysokim stężeniem bilirubiny), taką próbkę należy rozcieńczyć wodą LRW i przetestować ponownie. Przy raportowaniu wyników trzeba uwzględnić rozcieńczenie, przemnażając wynik przez współczynnik rozcieńczenia.

Na ogół współczynnik rozcieńczenia wprowadza się przy konfiguracji oprogramowania dla próbki, a korekta jest stosowana automatycznie.

Uwaga:

- Każdy użytkownik testu powinien wdrożyć program kontroli jakości mający na celu zapewnienie bieglności w wykonywaniu testu zgodnie z przepisami obowiązującymi w danej lokalizacji.
- Zaleca się badanie próbek kontrolnych surowicy (ujemnych, bliskich wartości dopuszczalnych lub silnie dodatnich) w kontekście dalszych kontroli laboratoryjnych i dobrej praktyki laboratoryjnej. Nie są one zawarte w zestawie Fungitell®.

11. Interpretacja wyników

WYNIK UJEMNY

Wartości stężenia (1→3)-β-D-glukanu <60 pg/mL są interpretowane jako wyniki ujemne.

Laboratorium wykonujące test powinno poinformować lekarza zlecającego, że nie wszystkie infekcje grzybicze powodują podwyższenie stężenia (1→3)-β-D-glukanu w surowicy. Niektóre grzyby, jak na przykład należące do rodzaju *Cryptococcus*4, wytwarzają bardzo niskie stężenia (1→3)-β-D-glukanu. Grzyby z rzędu *Mucorales* takie jak *Abshidia*, *Mucor* i *Rhizopus*14 zgodnie z bieżącą wiedzą nie wytwarzają (1→3)-β-D-glukanu. Podobnie *Blastomyces dermatitidis* w fazie drożdży wytwarza niskie ilości (1→3)-β-D-glukanu, a w przypadku zastosowania testu Fungitell® u pacjentów z blastomykozą na ogół występuje nieoznaczalne stężenie (1→3)-β-D-glukanu¹.

WYNIK NIEOKREŚLONY

Wartości od 60 pg/mL do 79 pg/mL są uważane za niejednoznaczne. Zalecane jest pobranie dodatkowych próbek surowicy i ich przetestowanie. Częste pobieranie i testowanie próbek zwiększa użyteczność testu w procesie stawiania rozpoznania.

WYNIK DODATNI

Uzyskanie stężenia (1→3)-β-D-glukanu ≥ 80 pg/mL uznaje się za wynik dodatni. Wynik dodatni nie definiuje obecności choroby i należy go używać w skojarzeniu z wynikami innych ocen klinicznych w procesie stawiania rozpoznania.

12. Ograniczenia testu

- Lokalizacje tkanek objętych infekcją grzybiczą¹⁰, obtorbenie oraz ilość (1→3)-β-D-glukanu wytwarzanego przez niektóre grzyby mogą wpływać na stężenie tego analitu w surowicy. Zmniejszona zdolność do przekazywania (1→3)-β-D-glukanu do krwiobiegu może zmniejszać zdolność do wykrywania niektórych infekcji grzybiczych.
- U niektórych osób występuje podwyższone stężenie (1→3)-β-D-glukanu, które zawiera się w strefie wyniku nieokreślonego. W takich przypadkach zaleca się przeprowadzenie dodatkowych testów kontrolnych.
- Częstotliwość wykonywania testów u pacjenta będzie zależeć od względnego ryzyka infekcji grzybiczej. W przypadku pacjentów z grupy wysokiego ryzyka zaleca się pobieranie próbek co najmniej dwa-trzy razy na tydzień.
- Uzyskano wyniki dodatnie u pacjentów poddawanych hemodializom^{19,20,38}, pacjentów leczonych niektórymi produktami frakcjonowania krwi, jak albuminy surowicy i immunoglobuliny^{41,42} oraz w próbkach lub u pacjentów narazonych na kontakt z gazą i gąbkami chirurgicznymi zawierającymi glukan. Po narażeniu pacjentów na kontakt z gąbkami i gazą zawierającą (1→3)-β-D-glukan wymagane są 3–4 dni, aby stężenie (1→3)-β-D-glukanu w surowicy powróciło do wartości wyjściowej^{31,32}. W związku z tym należy wziąć pod uwagę moment pobrania próbek od pacjentów po zabiegach chirurgicznych.
- Próbki pozyskane metodą nakłucia palca lub piętą nie są dopuszczalne, gdyż wykazano, że zwilżony alkoholem gazik używany do przygotowania miejsc pobrania próbki (oraz potencjalnie gromadzenie się krwi na powierzchni skóry) powoduje kontaminację próbek. W przeprowadzonych dotychczas badaniach nie zaobserwowano różnic pomiędzy próbkami uzyskanymi metodą nakłucia naczyzna żylnego lub pobrania z dojścia centralnego^{26,27}.
- Kompleksowy przegląd czynników przyczyniających się do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich dla (1→3)-β-D-glukanu można znaleźć w publikacji Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)^{1*}.
- Poziomy test określono w odniesieniu do dorosłych pacjentów. Poziom prawidłowy i odcięcia dla niemowląt i dzieci jest w dalszym ciągu przedmiotem badań^{26,27}.

13. Charakterystyka

13.1 Poziom odcięcia i wartości oczekiwane

Przeprowadzone wielośrodkowe, prospektywne badanie³¹ mające na celu ocenę czułości diagnostycznej i swoistości diagnostycznej testu Fungitell® (patrz badania porównawcze poniżej) wykazało, że stężenia betaglukanu są podwyższone w toku różnych infekcji grzybiczych. Kiedy przy stężeniu wynoszącym co najmniej 80 pg/mL występują objawy przedmiotowe i podmiotowe, wartość predykcyjna występowania infekcji grzybiczej u pacjenta mieści się w zakresie od 74,4 do 91,7%. W przypadku braku objawów przedmiotowych i podmiotowych przy stężeniu mniejszym niż 60 pg/mL, wartość predykcyjna ujemna sięgała od 65,1% do 85,1%.

13.2 Skuteczność kliniczna

Przeprowadzono wielośrodkowe badanie prospektywne w celu zwalidowania charakterystyki testu Fungitell^{®31}. Ten test porównano z innymi standardowymi metodami wykrywania (t. powiewu krwi, badania histopatologicznego próbki biopsyjnej oraz wyników badania radiologicznego) przyzbie i fungemii.

Ten test użyto do przebadania próbek pochodzących od trzystu pięćdziesięciu dziewięciu (359) pacjentów. Od każdego pacjenta pobrano jedną próbkę. Pacjentami z grupy niskiego ryzyka były zdrowe osoby oraz osoby przyjęte do szpitala z powodów innych niż infekcje grzybicze. Kompletowanie uczestników prowadzono w sześciu ośrodkach klinicznych na terenie Stanów Zjednoczonych. Cztery z tych ośrodków klinicznych wykonały badania przy użyciu testu na łącznie 285 próbkach. Firma ACC przetestowała dwukrotnie wszystkie 359 próbek, lecz do oceny sprawności testu wykorzystala wyłącznie drugi zestaw wyników. Wyniki drugiego zestawu testów nie różniły się istotnie statystycznie od wyników pierwszego zestawu.

• **Czułość diagnostyczna**

Czułość dla całej populacji pacjentów (359), w tym pacjentów z kryptokożą, wyniosła 65,0% (60,1–70,0% 95% przedział ufności [CI]) (Tabela 1).

• **Swoistość diagnostyczna**

Swoistość wynosiła 81,1% (77,1–85,2% CI). Po analizie 170 pacjentów, u których nie wykryto infekcji grzybiczej oraz zdrowych osób swoistość testu wyniosła 86,5% (82,8–90,1% CI). Po uwzględnieniu dodatkowych 26 pacjentów, u których nie wykryto infekcji grzybiczej, lecz którzy cierpieli na inne schorzenia, uzyskano swoistość na poziomie 81,1% (77,1–85,2% CI).

| Tabela 1 Wyniki testu firmy ACC przy poziomie granicznym 60–80 pg/mL według ośrodka | | | | | | | | |
|---|---|---------|-----------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------|------------------------------|---------|
| Ośrodek | Udowodniona/prawdopodobna czułość ≥= 80 pg/mL | | | | Swoistość < 60 pg/mL | | | |
| | Dodanie K.lim. dodanie | Czułość | Wartość predykcyjna dodania | Ujemn./Klin. ujemne | Swoistość | Wartość predykcyjna ujemna | Niejednoznaczne 60 ≤< X < 80 | Łącznie |
| 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 | nd. | 0/0 | nd. | 0,0 | 0 | 1 |
| Łącznie | 106/163 | 65,0 | 80,9 | 159/196 | 81,1 | 76,8 | 21 | 359 |

Po porównaniu wyników uzyskanych przez firmę ACC (359 próbek) oraz ośrodki kliniczne (285 próbek) z rozpoznaniem klinicznym czułość wyniosła 64,3% (58,8–69,9% CI) w przypadku wyników uzyskanych przez firmę ACC oraz 61,5% (55,9–67,2% CI) w przypadku wyników uzyskanych przez ośrodki kliniczne. Swoistość wyniosła 86,6% (82,7–90,6% CI) w przypadku wyników uzyskanych przez firmę ACC oraz 79,6% (74,9–84,3% CI) w przypadku wyników uzyskanych przez ośrodki kliniczne.

Kandydoza

U 107 pacjentów biorących udział w tym badaniu prospektywnym rozpoznano kandydozę. U 83 z tych 107 pacjentów uzyskano dodatni wynik testu Fungitell®.

Firmie Associates of Cape Cod, Inc. przekazano sto siedemdziesiąt pięć próbek pobranych od pacjentów z kandydozą. Dodatni wynik testu uzyskano po przebadaniu 145 z tych 175 próbek.

Aspergiloza

Aspergilozę rozpoznano łącznie 10 pacjentów. U 8 z tych 10 pacjentów uzyskano dodatni wynik testu.

Fusarioza

Fusariozę rozpoznano u trzech pacjentów. U 2 z tych 3 pacjentów uzyskano dodatni wynik testu.

Stosowanie leków przeciwgrzybiczych

Wdrożenie leczenia przeciwgrzybiczego lub brak takiego leczenia nie miał statystycznie istotnego wpływu na czułość testu. 118 pacjentów chorowało na inwazyjną grzybicę oraz stosowało leczenie przeciwgrzybicze. U 82 pacjentów wynik testu był pozytywny (czułość: 69,5% 61,2–77,8% CI). Ponadto takie rozpoznanie postawiono u dwudziestu czterech (24) pacjentów, którzy nie przyjmowali żadnego leczenia przeciwgrzybiczego. U 18 pacjentów wynik testu był pozytywny (czułość: 75%; 57,7–92,3% CI).

13.3 Korelacje testu

Cztery z ośrodków klinicznych przetestowały łącznie 285 próbek. Wyniki testów przeprowadzonych w ośrodkach w 96,4% korelowały ilościowo z wynikami firmy Associates of Cape Cod, Inc. Korelacje wyników testów przeprowadzonych przez firmę Associates of Cape Cod, Inc. z wynikami uzyskanymi przez inne ośrodki testujące zawierały się w przedziale od 90,6 do 99,2%.

13.4 Precyzja

Test Fungitell® został oceniony pod kątem precyzji (tj. powtarzalności i odtwarzalności) z użyciem dziesięciu (10) różnych próbek, które badano w trzech ośrodkach badawczych podczas trzech różnych dni. Zmnioseno w ramach tego samego testu wahała się od 0,9% do 28,9% i służyła jako wskaźnik powtarzalności. Wartości między testami wahały się od 3,9% do 23,8% i służyły jako wskaźnik odtwarzalności. Z obu analiz wykluczono cztery (4) próbki z wynikiem ujemnym.

13.5 Zakres pomiarowy i liniowość

Wyniki są wyrażone w pg/mL surowicy i mogą mieć wartość z zakresu poniżej limitu wykrywania (<31 pg/mL) do >500 pg/mL. Wyniki są drukowane wartości dla stężenia przekraczającego 500 pg/mL, należy rozcieńczyć próbkę wodą odczynnikową LAL i ponownie przetestować. Jak opisano w punkcie „Kontrola jakości”, współczynnik korelacji (r) krzywej wzorcowej (liniowy vs liniowy) obejmujący zakres pomiarowy testu Fungitell® powinien wynosić ≥ 0,980, a wartości prędkości zmian (np. jednostki miliabsorbancji na minutę) dla kontroli ujemnych powinny wynosić mniej niż 50% prędkości dla najniższego wzorca. W przeciwnym wypadku należy powtórzyć test z wykorzystaniem nowych odczynników.

13.6 Substancje zakłócające













Następujące stany dotyczące próbki mogą zakłócać uzyskiwanie dokładnego wyniku testu Fungitell®:

- Próbki odbarwione lub mętne, co wynika m.in. z nadmiernej hemolizy, lipemii lub zbyt wysokiego stężenia bilirubiny, mogą powodować interferencje optyczną z testem. W razie testowania takich próbek należy sprawdzić wyniki testu pod kątem dowodów na interferencje optyczną i/lub niezwykle schematy kinetyczne.
- Podwyższone stężenie immunoglobuliny G, jakie może przykładowo występować w surowicy w przebiegu szpiczaka miedzi, może skutkować wytrąceniem się osadu w obęrgie mieszaniny reakcyjnej po dodaniu odczynnika Fungitell® do surowicy poddanej wstępnej obróbce²⁰.
- Do czasu przygotowania niniejszego dokumentu nie opisano żadnego aktywującego czynnika G (elementu wykrywającego (1→3)-β-glukan) odczynnika Fungitell® poza (1→3)-β-glukanem. W niektórych badaniach, w których stwierdzono reaktywność krzyżową, przygotowanie rzekomego materiału aktywującego za pomocą oczyszczonej (1→3)-β-glukanazy eliminowało sygnał, co wykazało, że obserwowana aktywacja była spowodowana zanieczyszczeniem (1→3)-β-glukanem¹. Zanieczyszczenie proteazy serynowej może również powodować uwalnianie para-nitroaniliny w mieszaninach reakcyjnych testu Fungitell®, jednak jest ona neutralizowana podczas obróbki wstępnej.

14. Metaanalizy

Ponadto opublikowano liczne, poddawane przeglądowi branżowemu badania w temacie wspierającego zastosowania stężenia (1→3)-β-D-glukanu w surowicy przy diagnozowaniu inwazyjnej grzybicy, łącznie z metaanalazą skuteczności diagnostycznej^{1,24,35,37}.

15. Legenda symboli

| | | | |
|---|---|---|---|
|  | „Termin przydatności do użycia” |  | „Zapoznaj się z instrukcją stosowania” |
|  | „Zawiera ilość materiału wystarczającą do <N> badań” |  | „Upoważniony przedstawiciel” |
|  | „Kod partii” |  | „Oznaczenie CE” |
|  | „Wyrob medyczny przeznaczony do diagnostyki in vitro” |  | „Produkt dostępny wyłącznie na receptę” |
|  | „Nr katalogowy” |  | „Przestroga” |
|  | „Ograniczenia dot. temperatury” |  | „Chronić przed światłem słonecznym” |
|  | „Producent” | | |

16. Upoważnieni przedstawiciele

 Emergo Europe

Prinssessegracht 20, 2514 AP, The Hague, Holandia

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

Uwaga: Wszelkie poważne zdarzenia związane z wyrobem należy zgłaszać do producenta oraz do właściwych organów na terenie kraju członkowskiego, w którym użytkownik i (lub) pacjent ma siedzibę.

17. Dane kontaktowe

Centrala korporacji

Associates of Cape Cod, Inc.

124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536-4445 USA

Tel.: (888) 395-2221 lub (508) 540-3444 • Faks: +1 (508) 540-8680

E-mail: custservice@acciusa.com • www.acciusa.com

Wielka Brytania

Associates of Cape Cod Int’l, Inc.

Deacon Park, Moorgate Road, Knowles, Liverpool L33 7RX, Wielka Brytania

Tel.: (44) 151–547–7444 • Faks: (44) 151–547–7400

E-mail: info@acciuk.co.uk • www.acciuk.co.uk

Europa

Associates of Cape Code Europe GmbH

Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Niemcy

Tel.: (49) 61 05–96 10 0

18. Historia zmian

Ver. od 0 do 11: Zmieniono badania w trzech powtórzeniach na badania w dwóch powtórzeniach. Zastąpiono wodę oczyszczoną wodą odczynnikową LAL. Połączone składniki KCl i KOH w zasadowy roztwór obróbki wstępnej. Usunięto mikropltykę z zestawu i oznaczono jako materialny wymagany, ale niedostarczony. Zmieniono przedstawiciela we Wspólnocie Europejskiej i dodano sponsora australijskiego. Pomniejsze wyjaśnienia, formatowanie, dodanie symboli, dodatkowe substancje zakłócające.

19. Piśmiennictwo

- Odabasi, Z., Patrzniak, 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/Infectious Fungal Infections/Consensus Group and the National Institutes of Allergy and Infectious Disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Concensus 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.

6. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. Transp. 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-Flörl, 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. Litvinseva, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grgurich, D.E., Kerkerink, T.M., Bensch, J.R., and Archer, B.J. 2010. β-D-glucan testing for diagnosis 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 hemophym 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 amoebocyte 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 Internationall 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., Iden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakata, 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., Patrzniak, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-glucan (βCG) 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. Račić, Z., Kocmanova, I., Lengrova, M., Weinbergrova, B., Buresova, L., Toskova, M., Wintrova, 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 hematological malignancies—high frequency of false-positive results and their analysis. J. Med. Microbiol. 2010; 59:1016-22.

27. Posteroar, B. De Pascale, G., Tambarello, 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-gluacan test in children. Clin. Vaccine Immunool. 14: 924-925.

29. Goudjil, S., Kongofo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-gluacan 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, J., Pappas, P.G., Sacki, 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 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