

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

SAGGIO FUNGITELL®

Istruzioni per l'uso



**ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED**

124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536, Stati Uniti

Telefono: (508) 540-3444
Numero verde: (888) 395-2221
Fax: (508) 540-8680
Assistenza tecnica: (800) 848-3248
Assistenza clienti: (800) 525-8378


42



PN001268-it Rev12

REF FT001

2023-06-13

 Per ottenere le istruzioni per l'uso in una lingua diversa, visitare il sito www.acciusa.com. Questo prodotto è esclusivamente per uso diagnostico in vitro e per uso professionale.

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

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

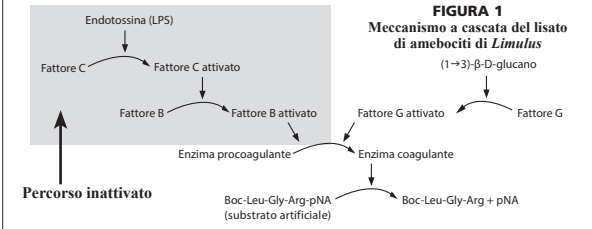
Importante
 Fornire le seguenti informazioni al medico richiedente: *alcuni generi fungini, come Cryptococcus, che produce livelli esigui di (1→3)-β-D-glucano, possono non produrre livelli sierici di (1→3)-β-D-glucano sufficientemente elevati da consentire il rilevamento mediante il saggio^{3,4}. È stato osservato che le infezioni da zigomiceti mucorali quali Absidia, Mucor e Rhizopus^{1,4}, non noti per la produzione di (1→3)-β-D-glucano, generano titoli sierici di (1→3)-β-D-glucano esigui. Inoltre, Blastomyces dermatitidis allo stato di lievito produce livelli bassi di (1→3)-β-D-glucano e può quindi non essere rilevato dal saggio⁵.*

Questa dichiarazione deve essere allegata a tutti i referti dei risultati del saggio Fungitell®.

2. Sommario e spiegazione
 L'incidenza delle micosi causate da agenti patogeni opportunisti è in aumento, in particolare tra i pazienti immunocompromessi^{6,7}. Le micosi invasive, in qualità di infezioni opportuniste, sono frequenti tra i pazienti affetti da neoplasie ematologiche maligne e da AIDS e sono responsabili di un numero sempre maggiore di infezioni nosocomiali, in particolare tra i soggetti sottoposti a trapianto di organi e altri pazienti in terapia immunosoppressiva¹⁰. Molte patologie micotiche vengono acquisite tramite inalazione di spore fungine provenienti da suolo, detriti vegetali, impianti di climatizzazione e/o superfici esposte. Alcuni miceti opportunisti sono presenti nella o sulla cute umana, nel tratto intestinale e nelle mucose^{11,12}. La diagnosi delle micosi invasive e delle fungemie si basa generalmente su tecniche diagnostiche o radiologiche di natura non specifica. Di recente, ai metodi diagnostici disponibili si sono aggiunti dei marcatori biologici di micosi³.

I patogeni micotici opportunisti includono *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* e *Pneumocystis jirovecii*. Il (1→3)-β-D-glucano prodotto da questi e da altri organismi è rilevabile mediante il saggio Fungitell®^{1,8,13,14}.

3. Principio della procedura
 Il saggio Fungitell® misura il (1→3)-β-D-glucano sierico ed è un saggio basato su una modifica del meccanismo a cascata del lisato di amebociti di *Limulus*(LAL)^{15,16,17,18}, Figura 1. Il reagente Fungitell® è stato modificato in modo da eliminare la reattività alle endotossine batteriche e da reagire, quindi, esclusivamente con il (1→3)-β-D-glucano, tramite la tappa del meccanismo a cascata mediata dal fattore G. Il (1→3)-β-D-glucano attiva il fattore G, uno zimogeno della serin proteasi. Il fattore G attivato converte l'enzima procoagulante inattivo in enzima coagulante attivo, che a sua volta separa la para-nitroanilide (pNA) dal substrato cromogeno peptidico (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA), liberando un cromoformo (la para-nitroanilina) che assorbe a 405 nm. Il saggio cinetico Fungitell® descritto in questa sede si basa sulla determinazione del tasso di aumento della densità ottica prodotto dal campione. Questo tasso viene interpretato in base a una curva standard che permette di stimare la concentrazione di (1→3)-β-D-glucano presente nel campione.



4. Materiali forniti con il kit Fungitell®
 Il kit Fungitell® è formulato per l'uso diagnostico in vitro. I seguenti materiali forniti in dotazione a ciascun kit sono sufficienti per l'analisi di 110 pozzetti su due piastre per microtitolazione (da 55 pozzetti ciascuna).

- Reagente Fungitell®, un LAL liofilizzato specifico per il (1→3)-β-D-glucano (due fiale). Il reagente Fungitell® è costituito dal lisato di amebociti di *Limulus* (ossia, *Limulus polyphemus*) e dal substrato colorimetrico Boc-Leu-Gly-Arg-pNA. Non contiene proteine umane o di mammifero.
- Tampone di ricostituzione Pyrosol® (due fiale); altre fiale di tampone di ricostituzione Pyrosol® (n. di catalogo BC051) possono essere acquistate separatamente. È costituito da Tris buffer 0.2M.
- Standard per glucano, (1→3)-β-D-glucano liofilizzato da Pachyman (due fiale). Il volume di acqua per reagente da aggiungere è indicato sull'etichetta della fiale. È calibrata rispetto a uno standard interno di riferimento.
- Acqua per reagente LAL (LRW) (due flaconi)
Nota: l'acqua di grado reagente (RGW) da 20 ml ed LRW nelle fiale di vetro sono equivalenti.
- Soluzione alcalina pre-trattamento (due fiale) che contiene 0.125 M KOH e 0.6 M KCl

Nessuno dei suddetti componenti, ad eccezione dello standard, contiene livelli di (1→3)-β-D-glucano in grado di causare interferenza.

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

- Puntali per pipette* (250 µL - N. di catalogo PPT25; 1000 µL - N. di catalogo PPT10)
- Pipettatori con volumi di erogazione di 5-25 µL e 100-1000 µL
- Pipettatori a ripetizione con punte a siringa in grado di erogare 100 µL
- Provette di analisi* per la preparazione della serie di standard (curva di calibrazione) e per la combinazione dei reagenti per il trattamento del siero (12 x 75 mm - N. di catalogo TB240 oppure 13 x 100 mm - N. di catalogo TB013)
- Lettere di piastre con incubatore (37 °C) in grado di effettuare la lettura a 405 nm (ma preferibilmente in grado di effettuare il monitoraggio a lunghezza d'onda doppia di 405 e 490 nm) con range dinamico di almeno 2,0 unità di assorbanza, con apposito software per i saggi cinetici
- Provette sterili, senza glucano, per il frazionamento dei campioni È possibile utilizzare provette che siano certificate per l'assenza di RNAsi, DNAsi e pirogenicità.
- Parafilm®
- Micropiastre a 96 pozzetti* **Nota:** i requisiti del saggio Fungitell® sono stati convalidati con le piastre dotate delle seguenti caratteristiche: in polistirene, sterili, non rivestite, a fondo piatto, prive di beta glucano in grado di causare interferenza (in ottemperanza alle specifiche ACC) e avvolte singolarmente.

* Questi prodotti forniti da Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) sono certificati per l'assenza di glucani interferenti.

6. Conservazione dei reagenti

- Conservare tutti i reagenti, nelle condizioni in cui sono forniti, in ambiente buio a 2-8 °C.
- Il reagente Fungitell® ricostituito deve essere conservato a 2-8 °C e utilizzato entro 2 ore. In alternativa, il reagente Fungitell® ricostituito può essere congelato a -20 °C per un massimo di 20 giorni, scongelato una volta e utilizzato.

7. ⚠️ Avvertenze e precauzioni

- Non pipettare alcun materiale con la bocca. Non fumare né consumare cibi o bevande nelle aree destinate al trattamento dei campioni o dei reagenti del kit.
- Attenersi ai regolamenti in materia di sicurezza vigenti a livello locale e adottati dal laboratorio.
- Indossare guanti protettivi durante la manipolazione dei campioni biologici che potrebbero essere pericolosi o infettivi. Anche se protette dai guanti, le mani devono essere considerate sempre contaminate; tenerle lontano da occhi, bocca a naso. Indossare occhiali protettivi e mascherina chirurgica se esiste una possibilità di contaminazione da aerosol.
- Nota:** non utilizzare i kit con componenti danneggiati.
- Smaltimento: i residui chimici e dei preparati sono generalmente considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questa tipologia di rifiuti è normato dalle leggi e dai regolamenti nazionali e regionali. Per informazioni sullo smaltimento dei rifiuti pericolosi, contattare le autorità locali o le società che si occupano della gestione dei rifiuti.
- Le **schede dati di sicurezza** per tutti i componenti del kit Fungitell® sono scaricabili dal sito Web di ACC: www.acciusa.com.

7.1 Precauzioni procedurali
 Nel contesto dell'esecuzione del saggio Fungitell® è necessario prestare rigorosa attenzione alla tecnica utilizzata e all'ambiente di analisi. Un accurato addestramento del tecnico alla metodologia di esecuzione del saggio e alla prevenzione della contaminazione è essenziale ai fini dell'efficacia del saggio.

- Utilizzare la buona prassi di laboratorio in base ai regolamenti locali in vigore. Questo saggio è sensibile alla contaminazione e alla scarsa accuratezza di pipettaggio.

- Predisporre un ambiente pulito in cui eseguire il saggio.
- Tenere presente che sia la contaminazione da glucani sia la contaminazione da particelle fungine derivanti da corpo umano, indumenti, contenitori, acqua e polveri presenti nell'aria possono interferire con il saggio Fungitell®.
- Tra le possibili fonti di contaminazione sono inclusi i materiali contenenti cellulosa come le garze, le salviette di carta e le scatole di cartone, le pipette di vetro con tappi in cotone e i puntali per pipetta con filtri in cellulosa. Anche le medicazioni in garza chirurgica e le spugne possono secernere grosse quantità di (1→3)-β-D-glucano^{1,12}. Per informazioni sulle altre fonti di contaminazione correlate al paziente, consultare la sezione Limitazioni del saggio.
- Non usare i materiali dopo la data di scadenza indicata.

7.2 Trattamento dei campioni

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

8. Procedura
8.1 Impostazione dello strumento e programmazione del saggio

Le impostazioni possono variare a seconda degli strumenti e dei software usati. In generale vale quanto segue: configurare il software del lettore di piastre per la raccolta dei dati in modalità Vmean. Consultare il manuale del software per determinare le impostazioni corrette, affinché il valore calcolato corrisponda al tasso medio di variazione della densità ottica per tutti i punti di dati raccolti. Impostare l'intervallo di lettura del rivelatore sul minimo consentito dal software/strumento nell'ambito dei 40 minuti del test. Le impostazioni di lunghezza d'onda del software devono essere pari a 405 nm con sottrazione del background a 490 nm. Si consiglia di utilizzare entrambe le lunghezze d'onda, ma se la lettura a lunghezza d'onda doppia non è disponibile, eseguire la lettura a 405 nm ed esaminare la curva cinetica di ogni campione dei pazienti alla ricerca di segni di interferenza (per maggiori dettagli, vedere la Sezione 9.0). La temperatura di incubazione deve essere impostata su 37 °C. Impostare la miscelazione/agitazione della piastra in modo che avvenga per 5-10 secondi prima dell'avvio della lettura. Impostare l'adattamento della curva su "lineare/lineare" o equivalente. La lettura avrà inizio senza alcuna attesa.

8.2 Preparare lo standard per glucano incluso nel kit.

a. Sciogliere il contenuto di una fiala di standard per glucano nel volume di LRW indicato sulla fiala, per ottenere una soluzione di 100 pg/ml. Agitare mediante vortex per almeno 30 secondi a velocità da media a medio-alta per ricostituire lo standard (soluzione 1). La soluzione di glucano deve essere conservata a 2-8 °C e utilizzata entro tre giorni. I passaggi b-e che seguono illustrano un esempio di procedura per la preparazione di una curva standard.

b. Preparare uno standard di 50 pg/ml (soluzione 2) miscelando 500 µL di LRW e 500 µL di soluzione 1 in una provetta priva di glucano (soluzione 2). Agitare mediante vortex per almeno 10 secondi.

c. Preparare uno standard di 25 pg/ml (soluzione 3) miscelando 500 µL di LRW e 500 µL di soluzione 2 in una provetta priva di glucano (soluzione 3). Agitare mediante vortex per almeno 10 secondi.

d. Preparare uno standard di 12,5 pg/ml (soluzione 4) miscelando 500 µL di LRW e 500 µL di soluzione 3 in una provetta priva di glucano (soluzione 4). Agitare mediante vortex per almeno 10 secondi.

e. Preparare uno standard di 6,25 pg/ml (soluzione 5) miscelando 500 µL di LRW e 500 µL di soluzione 4 in una provetta priva di glucano (soluzione 5). Agitare mediante vortex per almeno 10 secondi.

8.3 Aprire la soluzione alcalina pre-trattamento.
 La soluzione alcalina pre-trattamento converte i glucani a tripla elica in glucani a singolo filamento¹⁹ che nel saggio risultano più reattivi. Inoltre, il suo pH alcalino inattiva le proteasi e gli inibitori presenti nel siero che potrebbero interferire con il saggio.²⁴

Smaltire la fiala (in base alle procedure del laboratorio) a meno che non si preveda di utilizzarla per un test successivo; in questo caso, coprirla con pellicola Parafilm (usando il lato della pellicola rivolto verso il supporto cartaceo).

8.4 Disporre la piastra per microtitolazione
 Disporre il layout della piastra per microtitolazione nel software, con gli standard (Std), i controlli negativi (Neg) e 21 campioni (Spl). Si consiglia il seguente layout:

	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												

Inserire le concentrazioni degli standard nel software come 500, 250, 125, 62,5 e 31 pg/ml.

Nota che le concentrazioni degli standard inserite sono di cinque volte maggiori rispetto a quelle preparate nella precedente Sezione 8.2, poiché il volume degli standard usati nel saggio è di 25 µL per pozzetto, ovvero una quantità di cinque volte maggiore rispetto al volume del campione di siero usato (vedere la Sezione 8.5 b. più avanti). Di conseguenza il campione di siero viene adeguatamente diluito per cinque volte rispetto allo standard. Moltiplicare le concentrazioni standard per cinque compensa questa diluizione.

Nota: è possibile usare i pozzetti esterni, purché il loro rendimento sia stato dimostrato come rapportabile a quello dei pozzetti interni.

Nota: ai fini della curva standard non viene usato alcun controllo negativo.

8.5 Aggiungere il siero e la soluzione alcalina pre-trattamento.

a. Scongelare i campioni di siero congelati a temperatura ambiente. Agitare bene mediante vortex tutti i campioni per almeno 30 secondi a velocità da media a medio-alta.

b. Trasferire 5 µL di campione di siero in ognuno dei pozzetti designati (Uk), come minimo in duplicato. Ripetere per tutti i restanti campioni di siero.

c. Aggiungere 20 µL della soluzione alcalina pre-trattamento a ciascun pozzetto contenente siero. Accertarsi che il siero e le goccioline di soluzione di pre-trattamento vengano a contatto tra loro. **Nota:** i passaggi b e c della procedura sono eseguibili in ordine inverso, in base alle preferenze del tecnico.
Nota: per evitare la contaminazione accidentale, dopo aver aggiunto i campioni e i reagenti ai pozzetti, coprire nuovamente la piastra.

d. Agitare la piastra per 5-10 secondi per miscelare il contenuto dei pozzetti (è possibile utilizzare la funzione di agitazione fornita dallo strumento di lettura della piastra); incubare quindi per 10 minuti a 37 °C, all'interno del lettore di piastre dotato di incubatore.

8.6 Ricostituire il reagente Fungitell®.
Nota: è possibile procedere alla ricostituzione del reagente durante la fase di incubazione prevista dal pre-trattamento. La coerenza delle tempistiche di ricostituzione migliora la riproducibilità poiché la reazione Fungitell® ha inizio all'atto della ricostituzione, sebbene a un livello basso.

Ricostituire una singola fiala di reagente Fungitell® aggiungendovi 2,8 ml di acqua ultrapura e 2,8 ml di tampone di ricostituzione Pyrosol con il pipettatore da 1000 µL. Coprire la fiala con pellicola Parafilm usando il lato della pellicola rivolto verso il supporto cartaceo. Agitare delicatamente la fiala per sciogliere completamente il contenuto (non agitare mediante vortex).

8.7 Aggiungere i controlli negativi e gli standard per glucano.
 Al termine dell'incubazione prevista dal pre-trattamento del siero (Sezione 8.5 d.), estrarre la piastra incubata dal lettore e aggiungere gli standard e i controlli negativi. Disposizione consigliata per gli standard e le rispettive concentrazioni:

- aggiungere 25 µL di LRW ai pozzetti G2 e G3;
- aggiungere 25 µL di soluzione standard 5 (6,25 pg/ml) ai pozzetti F2 e F3 etichettati 31,25 pg/ml;
- aggiungere 25 µL di soluzione standard 4 (12,5 pg/ml) ai pozzetti E2 e E3 etichettati 62,5 pg/ml;
- aggiungere 25 µL di soluzione standard 3 (25 pg/ml) ai pozzetti D2 e D3 etichettati 125 pg/ml;
- aggiungere 25 µL di soluzione standard 2 (50 pg/ml) ai pozzetti C2 e C3 etichettati 250 pg/ml;
- aggiungere 25 µL di soluzione standard 1 (100 pg/ml) ai pozzetti B2 e B3, etichettati 500 pg/ml.

8.8 Aggiungere il reagente Fungitell® e incubare la piastra.

- Aggiungere 100 µL di reagente Fungitell® a ciascuno dei pozzetti (contenenti controlli negativi, standard e campioni), utilizzando il pipettatore a ripetizione.
- Inserire la piastra nel lettore di micropiastre (stabilizzato a 37 °C), rimuovere il coperchio e agitare per 5-10 secondi.

Leggere la piastra **senza il coperchio** a 405 nm con sottrazione del background a 490 nm, per 40 minuti a 37 °C. **Nota** – Se lo strumento non dà il tempo necessario per togliere il coperchio tra l'operazione di agitazione e quella di lettura, agitare la piastra senza coperchio per consentirne la lettura senza il coperchio.

9. Calcolare i risultati
 Raccolgere i dati e analizzarli come segue: Esaminare i tracciati cinetici dei campioni di analisi e rilevare l'eventuale presenza di andamenti diversi da un incremento regolare rapportabile a quelli degli standard. Invalidare i tracciati indicanti interferenza ottica (ad es., i casi in cui gli andamenti cinetici non seguono quelli degli standard). Calcolare il tasso medio di variazione della densità ottica (unità di milliassorbanza al minuto), per tutti i punti tra 0 e 40 minuti (il calcolo viene eseguito dal software). Interpolare le concentrazioni di (1→3)-β-D-glucano dei campioni in base alla curva standard (l'interpolazione viene eseguita dal software).

10. Controllo di qualità

- Il coefficiente di correlazione (r) della curva standard (lineare/lineare) deve essere ≥0,980.
- I pozzetti contenenti 25 µL di LRW fungono da controlli negativi. I tassi della velocità (ad es. unità di milliassorbanza al minuto) dei controlli negativi devono essere inferiori al 50% dei tassi standard più bassi. In caso contrario, il saggio deve essere ripetuto usando reagenti completamente nuovi.
- Manipolazione dei campioni complessi. Se il tecnico osserva comportamenti cinetici inusuali durante l'analisi di un campione, ad es. un campione opaco, scolorito o torbido (come un campione macroscopicamente emolizzato, lipemico o contenente bilirubina in quantità eccessiva), il campione deve essere diluito con LRW e rianalizzato. Di questa diluizione è necessario tener conto ai fini della refertazione dei risultati moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione. **Generalmente, il fattore di diluizione viene inserito durante la**

configurazione del software per il campione, e la correzione necessaria viene applicata automaticamente.

Nota:

- Ciascun utilizzatore del saggio deve stabilire un programma di controllo di qualità che garantisca la competenza dei tecnici nell'esecuzione del saggio in base alle norme applicabili presso il laboratorio.
- Si consiglia di analizzare i campioni di controllo del siero (negativi, vicini al valore limite o nettamente positivi) nel contesto di ulteriori controlli di laboratorio e della buona prassi di laboratorio. Questi ulteriori controlli non sono inclusi nel kit Fungitell®.

11. Interpretazione dei risultati RISULTATO NEGATIVO
Valori di (1→3)-β-D-glucano <60 pg/ml vengono interpretati come risultati negativi.

Il laboratorio che esegue il test deve informare il medico richiedente del fatto che non tutte le infezioni fungine evidenziano livelli elevati di (1→3)-β-D-glucano nel siero. Alcune specie fungine, come il genere *Cryptococcus*3,4, producono livelli esigui di (1→3)-β-D-glucano. I Mucorales, come *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus*1,4, in genere non producono (1→3)-β-D-glucano. Analogamente, *Blastomyces dermatitidis* allo stato di lievito produce bassi livelli di (1→3)-β-D-glucano, e i pazienti affetti da blastomicosi evidenziano generalmente livelli non rilevabili di (1→3)-β-D-glucano nell'ambito del saggio Fungitell®.

RISULTATO INDETERMINATO
I valori compresi tra 60 e 79 pg/ml sono considerati inconcludenti. Si consiglia il prelievo e l'analisi di ulteriori campioni di siero. Una maggiore frequenza di prelievo e di analisi migliora l'utilità del saggio ai fini della diagnosi.

RISULTATO POSITIVO
I valori di (1→3)-β-D-glucano ≥ 80 pg/ml vengono interpretati come un risultato positivo. Un risultato positivo non definisce la presenza della malattia e deve essere utilizzato contestualmente ad altri esiti clinici per formulare la diagnosi.

- Limitazioni del test**
 - Le sedi tissutali della micosi¹⁰, l'incapsulamento e la quantità di (1→3)-β-D-glucano prodotta da determinati miceti possono influire sulla concentrazione dell'analita nel siero. Una ridotta capacità di liberare (1→3)-β-D-glucano nel circolo ematico può compromettere il rilevamento di alcune micosi.
 - Alcuni soggetti presentano livelli elevati di (1→3)-β-D-glucano che rientrano nella fascia indeterminata. In tali casi, si consiglia di procedere ad ulteriori test di sorveglianza.
 - La frequenza dell'analisi dipenderà dal rischio relativo di micosi del paziente. Per i pazienti a rischio si consiglia il prelievo di campioni almeno due o tre volte alla settimana.
 - Sono stati riscontrati risultati positivi nei pazienti emodializzati^{19,20,38} in soggetti trattati con determinati prodotti del frazionamento ematico come albumina sierica e immunoglobuline^{23,25} e in campioni o soggetti esposti a garze e spugne chirurgiche contenenti glucano. Il ripristino dei livelli al basale di (1→3)-β-D-glucano nel siero richiede 3-4 giorni di tempo dopo l'esposizione a spugne e garze contenenti (1→3)-β-D-glucano in sede chirurgica¹². La tempistica di prelievo dei campioni dai pazienti chirurgici deve tener conto di questo fatto.
 - Non sono accettabili campioni ottenuti con puntura del tallone o del polpastrello, in quanto la garza imbevuta di alcol usata sulla cute (e potenzialmente anche l'accumulo di sangue sull'epidermide) si è dimostrata essere fonte di contaminazione per i campioni. Gli studi condotti fino ad oggi non hanno sottolineato alcuna differenza tra i campioni prelevati attraverso una linea venosa o mediante puntura venosa^{26,27}.
 - Per un'analisi completa dei fattori che contribuiscono ai falsi positivi di (1→3)-β-D-glucano, consultare Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)⁹.
 - I livelli di analisi sono stati stabiliti su soggetti adulti. I livelli normali e di cut-off per la popolazione infantile e pediatrica sono in fase di studio^{28,29}.

- Caratteristiche delle prestazioni**
 - 13.1 Valori di cut-off e valori previsti**

Uno studio prospettico multicentrico¹¹ condotto per stabilire la sensibilità diagnostica e la specificità diagnostica del saggio Fungitell® (vedere l'analisi di confronto di seguito) ha dimostrato che i valori di beta glucano sono aumentati in svariate micosi. In presenza di segni e sintomi a un livello di 80 pg/ml o superiore, il valore predittivo di positività di un soggetto per la micosi va dal 74,4% al 91,7%. In assenza di segni e sintomi a un livello inferiore a 60 pg/ml, il valore predittivo di negatività va dal 65,1% all'85,1%.

- 13.2 Prestazioni cliniche**

Uno studio prospettico multicentrico è stato condotto allo scopo di convalidare le caratteristiche delle prestazioni del saggio Fungitell^{®21}. Il saggio è stato messo a confronto con altre metodiche standard di rilevamento (ovvero emocoltura, esame istopatologico di campione bioptico e studi radiologici) di micosi e fungemie.

Trecentocinquantanove (359) soggetti sono stati testati con il saggio. Ogni soggetto ha fornito un singolo campione. I soggetti a basso rischio comprendevano individui apparentemente sani e pazienti ricoverati presso centri clinici per motivi diversi dalle micosi. I soggetti sono stati arruolati presso sei centri clinici negli Stati Uniti. Quattro di questi centri clinici hanno eseguito il saggio, analizzando un totale di 285 campioni. ACC ha testato tutti e 359 i campioni due volte; ai fini della determinazione delle prestazioni del saggio, però, ha usato solo il secondo set di risultati. I risultati di questo secondo set di analisi non hanno dimostrato alcuna differenza statistica da quelli del primo set.

- Sensibilità diagnostica**

La sensibilità per l'intera popolazione di soggetti (359), inclusi i pazienti affetti da criptococcosi, è stata del 65,0% (intervallo di confidenza [IC] al 95% pari a 60,1-70,0%) (Tabella 1).
- Specificità diagnostica**

La specificità è stata dell'81,1% (IC 77,1-85,2%). Quando sono stati presi in esame i 170 soggetti negativi all'infezione micotica e in condizioni di salute apparentemente buone, la specificità del saggio era dell'86,5% (IC 82,8%-90,1%). Con l'inclusione di altri 26 soggetti negativi per micosi ma affetti da altri disturbi, la specificità è passata all'81,1% (IC 77,1-85,2%).

Tabella 1 Risultati del test ACC al livello di cut-off di 60-80 pg/ml per cento								
Centro	Sensibilità conclamata/probabile >=80 pg/ml		Specificità <60pg/ml				Equivocei (60=>X<80)	Totale
	Pos(Clin. pos	Sensibilità	Valore Predittivo Positivo	Neg/Clin. neg	Specificità	Valore Predittivo Negativo		
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	N/A	0/0	N/A	0,0	0	1
Totale	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Rapportando i risultati ottenuti da ACC (359 campioni) e dai centri clinici (285 campioni) alla diagnosi clinica, la sensibilità è risultata del 64,3% (IC 58,8-69,9%) per ACC e del 61,5% (IC 55,9-67,2%) per i centri. La specificità è risultata dell'86,6% (IC 82,7-90,6%) per ACC rispetto al 79,6% (IC 74,9-84,3%) per i centri.

Candidosi
Durante lo studio prospettico, a 107 soggetti è stata diagnosticata con certezza una candidosi. 83 su 107 sono risultati positivi al saggio Fungitell®.

Dei 175 campioni forniti ad Associates of Cape Cod, Inc. dagli archivi della candidosi, 145 sono risultati positivi al saggio.

Aspergillosi
Un totale di 10 soggetti è risultato positivo per l'aspergillosi e 8 su 10 sono risultati positivi al saggio.

Fusariosi
Tre soggetti sono risultati positivi per la fusariosi e 2 su 3 sono risultati positivi al saggio.

Terapia farmacologica antimicotica
La presenza o l'assenza di terapia farmacologica antimicotica non ha avuto un effetto statisticamente significativo sulla sensibilità del saggio. 118 soggetti in terapia antimicotica sono stati accertati come positivi per infezione fungina invasiva. 82 sono risultati positivi al saggio (sensibilità del 69,5%; IC 61,2-77,8%). Inoltre, ventiquattro (24) soggetti accertati come positivi non erano sottoposti a terapia antimicotica. 18 sono risultati positivi al saggio (sensibilità del 75%; IC 57,7-92,3%).

- 13.3 Correlazione tra saggi**

Quattro dei centri clinici hanno testato un totale di 285 campioni. I risultati dei centri clinici hanno dimostrato una correlazione quantitativa del 96,4% con i risultati ottenuti da Associates of Cape Cod, Inc. Le correlazioni di Associates of Cape Cod, Inc. rispetto ai singoli centri di analisi sono risultate comprese tra il 90,6% e il 99,2%.

- 13.4 Precisione**

Il saggio Fungitell® è stato valutato relativamente alla precisione (ad es. ripetibilità e riproducibilità utilizzando dieci (10) campioni diversi, ciascuno analizzato per tre siti di analisi, in tre giorni diversi. La variazione tra saggi era compresa tra lo 0,9% e il 28,9% ed è stata utilizzata per misurare la ripetibilità. I valori inter-saggio erano compresi tra il 3,9% e il 23,8% ed è stata utilizzata per misurare la ripetibilità. I quattro (4) campioni negativi sono stati esclusi da entrambe le analisi.

- 13.5 Intervallo di misurazione e linearità**

I risultati sono espressi in pg/ml di siero e vanno da non rilevabile (<31 pg/ml) a >500 pg/ml; i risultati vengono stampati dal software o vengono letti in base alla curva standard. Per ottenere valori accurati oltre i 500 pg/ml è necessario diluire il campione con acqua per reagente LAL e ripetere il saggio. Come indicato nella sezione Controllo di qualità, il coefficiente di correlazione (r) della curva standard (lineare vs lineare) che copre l'intervallo di misurazione del saggio Fungitell® deve essere ≥0,980 e i tassi della velocità (ad es. unità di milliassorbza al minuto) dei controlli negativi devono essere inferiori al 50% dei tassi standard più bassi. In caso contrario, il saggio deve essere ripetuto usando reagenti completamente nuovi.

- 13.6 Sostanze interferenti**














Le seguenti condizioni del campione sono in grado di interferire con l'accuratezza dei risultati del saggio Fungitell®:

 - Campioni scoloriti o torbidi, come quelli macroscopicamente emolizzati, lipemici o contenenti bilirubina in quantità eccessiva, possono causare interferenza ottica nel contesto del saggio. A seguito dell'analisi di campioni di questo tipo, i risultati devono essere esaminati per escludere interferenza ottica e/o andamenti cinetici insoliti.**

- Livelli elevati di immunoglobulina G, come quelli riscontrati nel siero in presenza di mielomi multipli, possono provocare la formazione di precipitati nella miscela di reazione dopo l'aggiunta del reagente Fungitell® al siero pre-trattato⁹.
- Ad oggi, non sono stati descritti altri fattori G attivanti (elementi di rilevamento del (1→3)-β-glucano) del reagente Fungitell® oltre al (1→3)-β-glucano. In alcuni studi, in cui sono state fatte asserzioni di reattività crociata, il trattamento del presunto materiale attivante con (1→3)-β-glucanasi purificata ha eliminato il segnale, dimostrando che l'attivazione osservata era dovuta alla contaminazione da (1→3)-β-glucano⁴. In seguito al rilascio di para-nitroanilina nelle miscele di reazione Fungitell® può verificarsi anche una contaminazione da serin proteasi, ma queste vengono inattivate durante la procedura di pre-trattamento.

- 14. Meta-analisi**

Inoltre, sull'utilità del (1→3)-β-D-glucano sierico nella diagnosi delle infezioni fungine invasive sono stati pubblicati numerosi studi "peer-reviewed", incluse meta-analisi delle prestazioni diagnostiche^{32,34,35,36,37}.

15. Legenda dei simboli		
	"Usare entro il"	 "Consultare le istruzioni per l'uso"
	"Contenuto sufficiente per 'N' test"	 "Rappresentante autorizzato"
	"Codice del lotto"	 "Marchio CE"
	"Dispositivo medico per uso diagnostico in vitro"	 "Esclusivamente per l'uso su prescrizione"
	"N. di catalogo"	 "Attenzione"
	"Limiti di temperatura"	 "Tenere lontano dalla luce solare"
	"Produttore"	

16. Rappresentanti autorizzati
Sponsor australiano: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Australia

Nota: qualsiasi incidente grave verificatosi che sia riconducibile al dispositivo deve essere segnalato al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui risiede l'utilizzatore e/o il paziente.

17. Informazioni di contatto
Sede centrale
Associates of Cape Cod, Inc.
124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536-4445, Stati Uniti
Tel: (888) 395-2221 o (508) 540-3444 • Fax: (508) 540 8680
E-mail: custservice@acciusa.com • www.acciusa.com

Regno Unito
Associates of Cape Cod Int'L, Inc.
Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Regno Unito
Tel: (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, Germania
Tel.: (49) 61 05–96 10 0

- 18. Cronologia delle revisioni**

Modifiche da Rev 0 a Rev 11: Modifica delle analisi (da triplicato a duplicato); sostituzione dell'acqua di grado reagente con l'acqua per reagente LAL; combinazione dei componenti KCL e KOH nella soluzione alcalina pre-trattamento; rimozione della micropiastra dal kit, che viene mostrata come necessaria ma che non viene fornita; modifica del rappresentante CE e aggiunta dello sponsor australiano; piccoli chiarimenti, formattazione, aggiunta di simboli, ulteriori sostanze interferenti.

Rev 12: Rimozione di EC REP Emergo Europe.

- 19. Bibliografia**
 - Odabasi, Z., Pietznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-galucan 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.
 - Giroud, 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.
 - Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. New England Journal of Medicine. 1998: 338:1741-1751.
 - 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.

- Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin. Micro. Rev. 9: 499-511.
- Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002; 4 (Suppl. 3):32-37
- Lass-Flörl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses. 52: 197-205.
- Nucci, M. and Ananiss, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. Clin. Chest Med. 30: 295-306.
- Livintseva, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grgureich, 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.
- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Sasaki, 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.
- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemophylm clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.
- Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (1→3)-β-D-Glucaens. Carbohydrate Res. 218:167-174.
- 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.
- 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.
- Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Minima, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. Kidney International 60: 319-323.
- Kato, A., Takita, T., Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-β-D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
- Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Amezku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, 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.
- Mohr, J., Pietznick, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Racil, Z., Kocomanova, I., Lengeroova, M., Weinbergeroova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timinska, 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.
- Posterarò B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi,M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sangunetti, 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.
- 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.
- Goudjil, S., Kongolo, G., Dusol, L., Imstouren, 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.
- 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.
- 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.
- Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 52:750-70.
- Hou TY, Wang SH, Liang SX, Jiang WX, Luo DD, Huang DH. The Screening Performance of Serum 1,3-Beta-D-Glucan in Patients with Invasive Fungal Diseases: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. PLoS One. 2015 Jul 6;10:e0131602.
- Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. β-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECL1-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633-43.
- Onishi AI, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012; 50:7-15.
- Karageorgopoulos DE, Qu JM, Korhola IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39-49.
- He S¹, Hang JP², Zhang L¹, Wang F³, Zhang DC³, Gong FH⁴ A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-β-d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect; 2015 Aug;48:351-61.
- Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the *Limulus* Amoebocyte 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.
- 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