

Ensaio para (1→3)-β-D-glicano no soro

ENSAIO FUNGITELL®

Instruções de utilização



**ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED**

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

Telefone: (508) 540-3444
Linha gratuita: (888) 395-2221
Fax: (508) 540-8680
Assistência técnica: (800) 848-3248
Apoio ao cliente: (800) 525-8378


42



PN001268-pt Rev. 12

REF FT001

2023-06-13

 Visite o website www.acciusa.com para obter as instruções de utilização na sua língua. *Este produto destina-se exclusivamente ao diagnóstico in vitro e a utilização profissional.*

1. Aplicação

O ensaio **Fungitell®** é um ensaio colorimétrico à base de zimogénio de protease para a deteção qualitativa de (1→3)-β-D-glicano no soro de doentes com sintomas de infeção fúngica invasiva ou com condições clínicas que predisponham os doentes para esse tipo de infeção. A concentração sérica de (1→3)-β-D-glicano, um importante componente da parede celular de vários fungos importantes do ponto de vista médico¹, pode ser utilizada como auxiliar no diagnóstico de micoses profundas e fungemias². Um resultado positivo não indica o género do fungo que pode estar a causar a infeção.

Os títulos de (1→3)-β-D-glicano devem ser utilizados em conjunto com outros procedimentos de diagnóstico, como cultura microbiológica, exame histológico de amostras de biopsia e exame radiológico.

Importante

Forneça estas informações ao médico que solicita o teste: *Alguns fungos, como os pertencentes ao género Cryptococcus, produzem níveis de (1→3)-β-D-glicano muito baixos que poderão não produzir um nível de (1→3)-β-D-glicano sérico suficientemente elevado para ser detetado pelo ensaio¹. Também se observou que infeções por fungos da ordem Mucorales, como Absidia, Mucor e Rhizopus¹,4, para os quais não se conhece atividade de produção de (1→3)-β-D-glicano, produzem títulos séricos de (1→3)-β-D-glicano muito baixos. Além disso, a fase de levedura de Blastomyces dermatitidis produz pouco (1→3)-β-D-glicano e poderá não ser detetado pelo ensaio¹.*

Inclua esta declaração ao apresentar os resultados de teste do ensaio Fungitell®.

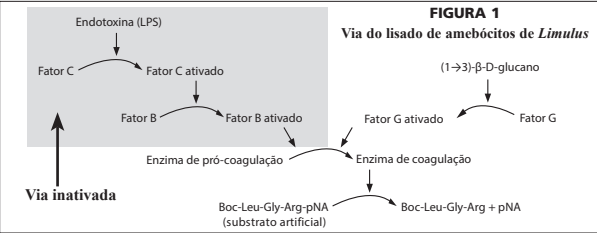
2. Resumo e explicação

Existe uma incidência crescente de infeções fúngicas por agentes patogénicos oportunistas, sobretudo em doentes imunocomprometidos⁶,7,8. As doenças fúngicas invasivas, como infeções oportunistas, são frequentes em tumores malignos hematológicos e em doentes com SIDA e correspondem a um número crescente de infeções nosocomiais, sobretudo em doentes transplantados e outros doentes medicados com tratamentos imunossupressores⁹,10. Muitas doenças fúngicas são adquiridas por inalação de esporos fúngicos provenientes do solo, detritos de plantas, sistemas de tratamento do ar e/ou superfícies expostas. Alguns fungos oportunistas estão presentes no interior da pele ou à sua superfície, no trato intestinal e nas membranas mucosas¹¹,12. O diagnóstico de micoses e fungemias invasivas baseia-se normalmente em técnicas não específicas de diagnóstico ou radiologia. Recentemente, foram adicionados marcadores biológicos de infeções fúngicas aos métodos de diagnóstico disponíveis¹.

Os agentes patogénicos fúngicos oportunistas incluem *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* e *Pneumocystis jirovecii*. O (1→3)-β-D-glicano produzido por estes e por outros organismos pode ser detetado pelo ensaio Fungitell®¹,8,13,14.

3. Princípio do procedimento

O ensaio Fungitell® mede o (1→3)-β-D-glicano. O ensaio é baseado numa modificação da via do lisado de amebócitos de *Limulus (LAL)*¹,15,17,18, Figura 1. O reagente *Fungitell®* é modificado para eliminar a reatividade das endotoxinas bacterianas e, portanto, reagir apenas ao (1→3)-β-D-glicano através do lado da via mediado pelo fator G. O (1→3)-β-D-glicano ativa o fator G, um zimogénio de serina protease. O fator G ativado converte a enzima de pró-coagulação inativa na enzima de coagulação ativa, que, por sua vez, cliva a paranitroanilida (pNA) a partir do substrato peptídico cromogénico, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, criando um cromóforo, a par-nitroanilina, com absorção a 405 nm. O ensaio cinético Fungitell®, descrito a seguir, baseia-se na determinação da taxa de aumento da densidade ótica produzida por uma amostra. Esta taxa é interpretada por comparação com uma curva padrão de modo a produzir estimativas da concentração de (1→3)-β-D-glicano na amostra.



4. Materiais fornecidos com o kit Fungitell®
O kit Fungitell® destina-se a ser utilizado em diagnóstico in vitro. Os seguintes materiais fornecidos com cada kit são suficientes para ensaios em 110 poços em duas placas de microtitulação (55 poços cada):

- Reagente Fungitell®, um LAL específico do (1→3)-β-D-glicano liofilizado (dois frascos). O reagente *Fungitell®* é composto por lisado de amebócitos de *Limulus* (ou seja, limulo) e substrato colorimétrico *Boc-Leu-Gly-Arg-pNA*. Não contém proteínas de seres humanos ou de mamíferos.
- Tampão de reconstituição Pyrosol® (dois frascos). Frascos adicionais de tampão de reconstituição Pyrosol (número de catálogo BC051) podem ser adquiridos em separado. É composto por tampão *Tris* 0,2 M.
- Padrão de glicano, (1→3)-β-D-glicano liofilizado de paquimano (dois frascos). O volume de água de grau reagente a ser adicionado está indicado no rótulo do frasco. Está calibrado contra um padrão de referência interno.
- Água de grau reagente (LRW) para LAL (dois frascos)
- Nota:** 20 ml de água de grau reagente (RGW) e LRW em frascos de vidro são equivalentes.
- Solução de pré-tratamento alcalina (dois frascos) que contém 0,125 M KOH e 0,6 M KCl

Todos os anteriores, com exceção do padrão, não contém níveis interferentes de (1→3)-β-D-glicano.

5. Materiais necessários mas não fornecidos

Nenhum material pode conter glicano interferente.

- Pontas de pipetas* (250 µl - n.º cat. PPT25, 1000 µl - n.º cat. PPT10)
- Pipetas com capacidade para dispensar volumes de 5 µl-25 µl e 100 µl-1000 µl
- Pipeta repetidora com pontas de seringa com capacidade para dispensar 100 µl
- Tubos de ensaio* para a preparação da série de padrões (curva de calibração) e combinação de reagentes de tratamento de soro (12 mm x 75 mm - n.º cat. TB240 ou 13 mm x 100 mm - n.º cat. TB013).
- Leitor de placa de incubação (37 °C) com capacidade de leitura a 405 nm (de preferência capaz de monitorizar dois comprimentos de onda, a 405 nm e a 490 nm) com um intervalo dinâmico de, pelo menos, 2,0 unidades de absorvância, juntamente com software de ensaio cinético informatizado adequado;
- Tubos esterilizados, sem glicano, para a aliquotaagem de amostras. Podem ser utilizados tubos certificados como sendo isentos de RNase, DNase e pirogénios.
- Parafilm®
- Microplacas com 96 poços* **Nota:** o ensaio Fungitell® foi validado com placas que têm as seguintes características: poliestireno, estéreis, não revestidas, fundo plano, sem beta-glicano interferente de acordo com as especificações da ACC e embrulhadas individualmente.

* Estes produtos, fornecidos pela Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), estão certificados como sendo isentos de glicanos interferentes.

6. Conservação dos reagentes

- ConsERVE todos os reagentes, tal como fornecidos, a uma temperatura de 2 °C-8 °C ao abrigo da luz.
- O reagente Fungitell® reconstituído deve ser conservado a uma temperatura de 2 °C-8 °C e utilizado dentro de 2 horas. Em alternativa, o reagente Fungitell® reconstituído pode ser congelado a -20 °C durante até 20 dias, descongelado uma vez e utilizado.

7. ⚠️ Advertências e precauções

- Não pipetar nenhum material com a boca. Não fumar, comer nem beber nas áreas de manuseamento de amostras ou reagentes do kit.
- Cumprir os regulamentos de segurança operacionais e locais.
- Usar luvas de proteção ao manusear amostras biológicas que possam ser infecciosas ou perigosas. As mãos enluvasadas devem ser consideradas contaminadas em todos os momentos; manter as mãos enluvasadas longe dos olhos, da boca e do nariz. Usar óculos de proteção e uma máscara cirúrgica se houver uma possibilidade de contaminação por aerossóis.
- Observação:** não utilize kits com conteúdo danificado.
- Eliminação: os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados perigosos. A eliminação deste tipo de resíduo é regulada por leis e regulamentos nacionais e regionais. Entrar em contacto com as autoridades ou empresas de gestão de resíduos locais para obter conselhos sobre a eliminação de resíduos perigosos.
- As fichas de dados de segurança** para todos os componentes do kit Fungitell® podem ser transferidas a partir do website da ACC: www.acciusa.com.

7.1 Precauções procedimentais

- O ensaio Fungitell® exige uma atenção rigorosa à técnica e ao ambiente de teste. A formação profissional completa do técnico sobre o método de ensaio e as formas de evitar a contaminação é fundamental para a eficácia do ensaio.
- Respeitar as boas práticas laboratoriais de acordo com os regulamentos locais. Este ensaio é sensível à contaminação e à inexistência da pipetagem.
- Prepare um ambiente limpo onde realizar o ensaio.
- Tenha em atenção que o glicano, assim como a contaminação por partículas fúngicas

provenientes do corpo humano, vestuário, recipientes, água e poeiras aéreas, podem interferir com o ensaio Fungitell®.

- Possíveis fontes de contaminação: materiais com celulose, como gazes, toalhetes de papel e papelão, pipetas de vidro com tampões de algodão e pontas de pipetas com filtros de celulose. As ligaduras de gaze e compressas cirúrgicas também podem libertar grandes quantidades de (1→3)-β-D-glicano²¹,22. Em relação a outras fontes de contaminação relacionadas com o doente, consultar a secção “Limitações” do teste.
- Não utilizar reagentes após o fim do prazo de validade.

7.2 Manuseamento de amostras

- A colheita de sangue e a preparação de soro devem ser realizadas de acordo com os regulamentos locais aplicáveis. Colheita de amostras: As amostras de sangue podem ser colhidas em tubos de preparação de soro ou tubos com separador de soro (SST) esterilizados, para a preparação do soro.
- Conservação de amostras: As amostras de soro podem ser conservadas a uma temperatura de 2 a 8 °C por um período de até 15 dias, ou congeladas a -20 °C por até 27 dias ou a -80 °C por até 4 anos.
- Rotulagem de amostras: As amostras devem ser identificadas de forma clara de acordo com práticas aprovadas pela instituição.

8. Procedimento

8.1 Configuração do instrumento e programação de testes

As definições podem variar com diferentes instrumentos e software. Em geral, aplicam-se as seguintes: Programe o software do leitor de placas para a recolha de dados no modo Vmean. Consulte as definições adequadas no manual do software para assegurar que o valor calculado é a taxa média da alteração da densidade ótica de todos os pontos de dados reunidos. Coloque o intervalo de leitura do detetor no mínimo permitido pelo software/instrumento durante o período de 40 minutos do teste. As definições do comprimento de onda do software devem ser de 405 nm menos o fundo a 490 nm. Recomenda-se a utilização dos dois comprimentos de onda caso a leitura bicromática não esteja disponível. Leia o teste a 405 nm e examine a curva cinética de cada amostra de doente quanto a sinais de interferência (ver Secção 9,0 para obter mais pormenores). A temperatura de incubação deve ser definida em 37 °C. A mistura/ agitação da placa deve ser definida para 5 a 10 segundos antes do início da leitura. Selecione a definição de ajuste da curva para “linear/linear” ou equivalente. A leitura deve começar sem qualquer atraso.

8.2 Preparação do padrão de glicano fornecido no kit.

- Dissolva um frasco do padrão de glicano com o volume de LRW indicado no frasco, para obter uma solução de 100 pg/ml. Misture no agitador de vórtex, pelo menos, 30 segundos em velocidade média-alta para reconstituir o padrão (solução 1). A solução de glicano deve ser conservada a 2 °C-8 °C e utilizada dentro de três dias. Os passos “b” a “e” abaixo ilustram um exemplo de um esquema de preparação de uma curva padrão.
- Prepare um padrão de 50 pg/ml (solução 2), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 1 num tubo isento de glicano (solução 2). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.
- Prepare um padrão de 25 pg/ml (solução 3), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 2 num tubo isento de glicano (solução 3). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.
- Prepare um padrão de 12,5 pg/ml (solução 4), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 3 num tubo isento de glicano (solução 4). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.
- Prepare um padrão de 6,25 pg/ml (solução 5), misturando 500 µl de LRW com 500 µl da solução 4 num tubo isento de glicano (solução 5). Misture no agitador de vórtex durante pelo menos 10 segundos.

8.3 Abra a solução de pré-tratamento alcalina.

A solução de pré-tratamento alcalina converte glicanos de tripla hélice em glicanos de cadeia simples¹¹,18, os quais são mais reativos no ensaio. Além disso, o pH alcalino serve para inativar as proteases e inibidores séricos que podem interferir com o ensaio.²³

Elimine o frasco (de acordo com os procedimentos laboratoriais) exceto se for utilizá-lo num teste a seguir, caso em que deverá tapá-lo com Parafilm, utilizando o lado do Parafilm que estava virado para o revestimento de papel.

8.4 Configuração da placa de microtitulação

Configure a disposição da placa de microtitulação no software com os padrões (Std), os controlos negativos (Neg) e 21 amostras (Spl). Recomenda-se a seguinte disposição:

	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												

Introduza as concentrações padrão nas definições do software como 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml e 31 pg/ml, respetivamente.

Tenha em atenção que as concentrações de padrão introduzidas são cinco vezes superiores às preparadas na Secção 8.2 acima. Isto deve-se ao facto de o volume de padrão utilizado no ensaio ser de 25 µl por poço, ou seja, cinco vezes o volume da amostra de soro utilizada (ver Secção 8.5 b a seguir). Desta forma, a amostra de soro é, na verdade, diluída cinco vezes em relação ao padrão. A multiplicação das concentrações de padrão por cinco compensa esta diluição.

Observação: os poços externos podem ser utilizados caso se tenha demonstrado que o desempenho destes poços é semelhante ao dos poços internos.

Observação: o controlo negativo não se destina a ser utilizado na curva padrão.

8.5 Adição do soro e da solução de pré-tratamento alcalina.

- Descongele as amostras de soro congeladas à temperatura ambiente. Misture bem todas as amostras no agitador de vórtex durante pelo menos 30 segundos em velocidade média a média-alta.
- Transfira 5 µl da amostra de soro para cada um dos poços designados (Uk) pelo menos em duplicado. Repita para cada amostra de soro.
- Adicione 20 µl de solução de pré-tratamento alcalina a cada poço que contenha soro. Certifique-se de que as gotículas de soro e de solução de pré-tratamento entram em contacto. Observação: os passos “b” e “c” podem ser realizados por ordem inversa segundo a preferência do técnico. Observação: para evitar a contaminação acidental, volte a colocar a tampa na microplaca depois de adicionar as amostras e os reagentes aos poços.
- Agite a placa durante 5 a 10 segundos para misturar o conteúdo do poço (poderá utilizar a função de agitação de placa do leitor) e, em seguida, incube durante 10 minutos a 37 °C no leitor da placa de incubação.

8.6 Reconstituição do reagente Fungitell®.

Observação: isto poderá ser feito de forma cómoda enquanto a incubação de pré-tratamento decorre. A consistência do momento da reconstituição melhorará a reprodutibilidade, uma vez que a reação do ensaio Fungitell® começa após a reconstituição, embora a um nível baixo.

Reconstitua um frasco de reagente Fungitell®, adicionando 2,8 ml de LRW e, em seguida 2,8 ml de tampão de reconstituição Pyrosol com a pipeta de 1000 µl. Tape o frasco com Parafilm utilizando o lado do Parafilm que estava virado para o revestimento de papel. Rode o frasco suavemente para dissolver na totalidade — não misture no agitador de vórtex.

8.7 Adição de controlos negativos e padrões de glicano.

- No fim da incubação de pré-tratamento do soro (Secção 8.5 d), retire a placa do leitor da placa de incubação e adicione os padrões e os controlos negativos à placa. Modelo de concentração de padrões recomendado:
- Adicione 25 µl de LRW aos poços G2 e G3.
 - Adicione 25 µl da solução de padrão 5 de 6,25 pg/ml aos poços F2 e F3, marcados como 31,25 pg/ml.
 - Adicione 25 µl da solução de padrão 4 de 12,5 pg/ml aos poços E2 e E3, marcados como 62,5 pg/ml.
 - Adicione 25 µl da solução de padrão 3 de 25 pg/ml aos poços D2 e D3, marcados como 125 pg/ml.
 - Adicione 25 µl da solução de padrão 2 de 50 pg/ml aos poços C2 e C3, marcados como 250 pg/ml.
 - Adicione 25 µl da solução de padrão 1 de 100 pg/ml aos poços B2 e B3, marcados como 500 pg/ml.

8.8 Procedimento de adição do reagente Fungitell® e incubação da placa.

- Adicione 100 µl de reagente Fungitell® a cada poço (contendo os controlos negativos, os padrões e as amostras) com a pipeta repetidora.
- Insira a placa no leitor de microplacas (equilibrado a 37 °C), retire a tampa e agite durante 5–10 segundos.

Leia a placa **sem a tampa** a 405 nm menos 490 nm, durante 40 minutos a 37 °C. Nota: se, por questões de tempo, o instrumento não permitir a remoção da tampa entre a agitação e a leitura, agite com a tampa retirada para assegurar a leitura sem a tampa colocada.

9. Cálculo dos resultados.

Recolha os dados e analise-os da seguinte forma: Examine as curvas cinéticas das amostras de teste e verifique se existem outros padrões, além de um aumento uniforme comparável ao dos padrões. Invalide os gráficos que indiquem interferência ótica (p. ex., os perfis cinéticos não seguem os dos padrões). Calcule a taxa média de alteração da densidade ótica (unidades de miliorvarcância por minuto) para todos os pontos entre 0 e 40 minutos (efetuado pelo software). Proceda à interpolação das concentrações de (1→3)-β-D-glicano da amostra a partir da curva padrão (efetuado pelo software).

10. Controlo de qualidade

- O coeficiente de correlação (r) da curva padrão (linear vs. linear) deve ser ≥ 0,980.
- Os poços com 25 µl de LRW são os controlos negativos. Os controlos negativos devem ter valores de taxa (p. ex., unidades de miliorvarcância por minuto) inferiores a 50% das taxas do padrão mais baixo. Se não for o caso, o ensaio deve ser repetido utilizando novos reagentes (todos).
- Tratamento de amostras complexas. Se o analista observar uma cinética invulgar num teste de uma amostra, p. ex, uma amostra turva, descorada ou com partículas (como amostras muito hemolisadas, lipémicas ou com bilirrubina excessiva), a amostra tem de ser diluída com LRW e ser novamente testada. Na apresentação dos resultados, é necessário ter a diluição em

consideração, multiplicando o resultado pelo fator de diluição. **Tipicamente, o fator de diluição é introduzido na configuração do software para a amostra e a correção é automaticamente aplicada.**

Observação:

- Cada utilizador do teste deve estabelecer um programa de controlo da qualidade para assegurar a proficiência no desempenho do teste, de acordo com os regulamentos aplicáveis à sua localização.
- Recomenda-se testar amostras de controlo sérico (negativo, próximo do valor-limite ou fortemente positivo) no contexto de verificações laboratoriais adicionais e das boas práticas laboratoriais. Estes não estão incluídos no kit Fungitell®.

11. Interpretação dos resultados

RESULTADO NEGATIVO

Valores de (1→3)-β-D-glucano < 60 pg/ml são interpretados como resultados negativos.

O laboratório a realizar o teste deve informar o médico que solicitou o teste de que nem todas as infeções fúngicas produzem níveis elevados de (1→3)-β-D-glucano no soro. Alguns fungos, como os do género *Cryptococcus*,3,4, produzem níveis muito baixos de (1→3)-β-D-glucano. Não se conhece qualquer atividade de produção de (1→3)-β-D-glucano por *Mucorales*, como *Abidia*, *Mucor* e *Rhizopus*¹⁴. De igual modo, o *Blastomyces dermatitidis*, na sua fase de levedura, produz pouco (1→3)-β-D-glucano, tendo os doentes com blastomicose normalmente níveis indetetáveis de (1→3)-β-D-glucano no ensaio Fungitell®.

RESULTADO INDETERMINADO

Valores entre 60 pg/ml e 79 pg/ml são considerados inconclusivos. Recomenda-se uma nova colheita e teste de soro. A colheita e o teste de amostras frequentes melhoram a utilidade do diagnóstico.

RESULTADO POSITIVO

Valores de (1→3)-β-D-glucano ≥ 80 pg/ml são interpretados como sendo um resultado positivo. Um resultado positivo não define a presença de doenças e deve ser utilizado em conjunto com outros resultados clínicos para se estabelecer um diagnóstico.

12. Limitações do teste

- As localizações da infeção fúngica nos tecidos³⁰, a encapsulação e a quantidade de (1→3)-β-D-glucano produzida por determinados fungos podem afetar a concentração deste analito no soro. A capacidade reduzida de contribuição de (1→3)-β-D-glucano para a corrente sanguínea pode reduzir a capacidade de deteção de determinadas infeções fúngicas.
- Alguns indivíduos têm níveis elevados de (1→3)-β-D-glucano que se situam na zona indeterminada. Nestes casos, recomenda-se um teste de vigilância adicional.
- A frequência de realização de testes ao doente dependerá do risco relativo de infeção fúngica. Recomendam-se taxas de colheita de amostras de pelo menos duas a três vezes por semana nos doentes em risco.
- Observaram-se resultados positivos em doentes hemodialisados^{19,20,38}, participantes tratados com determinados derivados de sangue fracionado, como albumina e imunoglobulinas séricas^{2,32} e em amostras ou participantes expostos a gazes e compressas cirúrgicas que continham glucano. Após a exposição cirúrgica a compressas e gazes com (1→3)-β-D-glucano, os doentes necessitam de três a quatro dias para a reposição dos níveis iniciais de (1→3)-β-D-glucano no soro^{21,22}. Da mesma forma, o momento da colheita de amostras a doentes cirúrgicos deve ter este fator em consideração.
- As amostras obtidas por métodos de picada no calcanhar ou dedo são inaceitáveis, uma vez que foi demonstrado que a compressa com álcool utilizada para preparar o local (e, potencialmente, a acumulação de sangue na superfície da pele) contamina as amostras. Nos estudos realizados até à data, não se observaram diferenças entre as amostras obtidas por colheitas em linha ou por venopunção^{26,27}.
- Para obter uma revisão abrangente dos fatores que contribuem para resultados falsos positivos para o (1→3)-β-D-glucano, queira consultar Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)⁹.
- Os níveis de teste foram estabelecidos em participantes adultos. Estão a ser investigados níveis normais e de “cut-off” para bebés e doentes pediátricos^{28,29}.

13. Características do desempenho

13.1 Cut-off e valores esperados

Um estudo multicêntrico, prospetivo⁹ realizado para determinar a sensibilidade e a especificidade de diagnóstico do ensaio Fungitell® (ver testes de comparação a seguir) demonstrou que os valores de beta glucano estão elevados para diversas infeções fúngicas. Quando surgem sinais e sintomas a um nível de 80 pg/ml ou superior, o valor preditivo de que o participante é positivo para uma infeção fúngica varia entre 74,4 e 91,7 por cento. Na ausência de sinais e sintomas em níveis inferiores a 60 pg/ml, os valores preditivos negativos variaram de 65,1% a 85,1%.

13.2 Desempenho clínico

Foi realizado um estudo multicêntrico, prospetivo para validar as características de desempenho do ensaio Fungitell®⁹. O teste foi comparado com outros métodos de deteção padrão (ou seja, hemocultura, exame histopatológico de amostra de biopsia e sinais radiológicos) de micoses e fungemias.

No ensaio, foram testados trezentos e cinquenta e nove (359) participantes. Foi obtida uma amostra única de cada participante. Os participantes de baixo risco incluíram indivíduos aparentemente saudáveis e indivíduos nos centros clínicos cujo internamento hospitalar se deve a outras razões além das infeções fúngicas. A adição de participantes foi realizada em seis centros clínicos nos Estados Unidos da América. Quatro dos centros clínicos efetuaram o ensaio e testaram um total de 285 amostras. A ACC testou todas as 359 amostras duas vezes, embora apenas o segundo conjunto de resultados tenha sido utilizado para determinar o desempenho do ensaio. Os resultados do segundo conjunto de análises não foram estatisticamente diferentes do primeiro conjunto.

• **Sensibilidade de diagnóstico**

A sensibilidade para toda a população de participantes (359), incluindo doentes com criptococose, foi de 65,0% (intervalo de confiança [IC] de 95%: 60,1%–70,0%) (Tabela 1).

• **Especificidade de diagnóstico**

A especificidade foi de 81,1% (IC de 77,1%-85,2%). Quando os 170 participantes negativos para infeção fúngica e indivíduos aparentemente saudáveis foram analisados, a especificidade foi de 86,5% com o ensaio (IC de 82,8%-90,1%). Quando foram incluídos os 26 participantes adicionais que foram negativos para infeção fúngica, mas tinham outras doenças, observou-se uma especificidade de 81,1% (IC de 77,1%-85,2%).

Tabela 1 Resultados do teste ACC no nível de “cut-off” de 60 pg/ml–80 pg/ml por cento								
Centro	Sensibilidade comprovada/provável ≥ 80 pg/ml			Especificidade < 60 pg/ml			Equipoco 60 ≤ X < 80	Total
	Pos./Clín. pos.	Sensibilidade	Valor preditivo positivo	Neg./Clín. neg.	Especificidade	Valor preditivo 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
Total	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Quando os resultados obtidos pela ACC (359 amostras) e pelos centros clínicos (285 amostras) foram comparados com o diagnóstico clínico, a sensibilidade foi de 64,3% (IC de 58,8%-69,9%) para a ACC e de 61,5% (IC de 55,9%-67,2%) para os centros. A especificidade foi de 86,6% (IC de 82,7%-90,6%) para a ACC versus 79,6% (IC de 74,9%-84,3%) para os centros.

Candidíase

No estudo prospetivo, houve 107 participantes com diagnóstico positivo de candidíase. Dos 107, 83 eram positivos com o ensaio Fungitell®.

A Associates of Cape Cod, Inc. forneceu cento e setenta e cinco amostras de biblioteca de candidíase, tendo 145 das 175 sido positivas no ensaio.

Aspergilose

Um total de 10 participantes eram positivos para aspergilose. Dos 10, 8 eram positivos com o ensaio.

Fusariose

Três participantes eram positivos para fusariose. Dos 3, 2 eram positivos com o ensaio.

Terapêutica medicamentosa antifúngica

A presença ou ausência de terapêutica medicamentosa antifúngica não teve qualquer efeito estatisticamente significativo na sensibilidade do ensaio. Constatou-se que 118 participantes eram positivos para infeção fúngica invasiva e estavam a fazer terapêutica antifúngica. Destes, 82 eram positivos com o ensaio (sensibilidade, 69,5%; IC de 61,2%-77,8%). Além disso, constatou-se que vinte e quatro (24) participantes eram positivos, mas não estavam a fazer terapêutica antifúngica. Destes, 18 eram positivos com o ensaio (sensibilidade,, 75%; IC de 57,7%-92,3%).

13.3 Correlações do teste

Quatro dos centros clínicos analisaram um total de 285 amostras. Os resultados dos testes nos centros tiveram uma correlação quantitativa de 96,4% com os resultados da Associates of Cape Cod, Inc. As correlações da Associates of Cape Cod, Inc. com os diferentes centros de teste variaram de 90,6% a 99,2%.

13.4 Precisão

O ensaio Fungitell® foi avaliado quanto à precisão (ou seja, repetibilidade e reprodutibilidade) utilizando (10) amostras diferentes que foram testadas, cada uma, por três centos de teste, em três dias diferentes. A variação intra-ensaio variou entre 0,9% e 28,9%, e serviu como uma medida da repetibilidade. Os valores inter-ensaio variaram entre 3,9% e 23,8%, e serviram como uma medida da reprodutibilidade. As quatro (4) amostras negativas foram excluídas de ambas as análises.

13.5 Intervalo de medição e linearidade

Os resultados são expressos em pg/ml de soro e variam desde não detetáveis (< 31 pg/ml) a > 500 pg/ml, e são impressos pelo software ou lidos a partir da curva padrão. Para valores exatos acima de 500 pg/ml, é necessário diluir a amostra com água de grau reagente para LAL e voltar a testá-la. Conforme indicado na secção Controlo de Qualidade, o coeficiente de correlação (r) da curva padrão (linear vs. linear) que abrange o intervalo de medição do ensaio Fungitell® deve ser ≥ 0,980 e os controlos negativos devem ter valores de taxa (p. ex., unidades de milabsorvância por minuto) inferiores a 50% das taxas do padrão mais baixo. Se não for o caso, o ensaio deve ser repetido utilizando novos reagentes (todos).

13.6 Substâncias interferentes

As condições seguintes podem interferir com a exatidão de um resultado do ensaio Fungitell®:














- As amostras descoradas ou turvas, como as amostras demasiado hemolisadas, lipémicas ou com bilirrubina excessiva, podem provocar uma interferência ótica com o ensaio. Se tais amostras forem testadas, os resultados dos testes deverão ser examinados pela existência de evidências de interferência ótica e/ou padrões cinéticos invulgares.

- Níveis elevados de imunoglobulina G, tais como os que podem existir no soro devido a múltiplos mielomas, podem resultar em precipitação na mistura de reação após a adição de Fungitell® ao soro pré-tratado⁹.
- Quando estas informações foram redigidas, não existia descrito qualquer fator G de ativação (elemento de deteção do (1→3)-β-glucano) do reagente Fungitell®, para além do (1→3)-β-glucano. Em alguns estudos, em que foram feitas asserções de reatividade cruzada, o tratamento do suposto material de ativação com (1→3)-β-glucanase purificada eliminou o sinal, demonstrando que a ativação observada tinha ocorrido por causa de (1→3)-β-glucano contaminante¹⁵. A contaminação com serina proteases também pode resultar na libertação de para-nitroanilina nas misturas de reação do Fungitell®, mas estas são desativadas como parte do processo de pré-tratamento.

14. Meta-análises

Além disso, foram publicados numerosos estudos revistos por pares sobre o tema do suporte baseado no (1→3)-β-D-glucano sérico no diagnóstico de doenças fúngicas invasivas, incluindo meta-análises do desempenho do diagnóstico^{22,34,35,36,37}.

15. Legenda dos símbolos

	“Prazo de validade”		“Consultar as instruções de utilização”
	“Conteúdo suficiente para ‘N’ testes”		“Mandatário”
	“Código do lote”		“Marca CE”
	“Dispositivo médico para diagnóstico in vitro”		“Apenas para utilização mediante prescrição médica”
	“N.º de catálogo”		“Atenção”
	“Limites de temperatura”		“Manter ao abrigo da luz solar”
	“Fabricante”		

16. Mandatários

Promotor australiano: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Austrália

Observação: qualquer incidente grave que ocorra relacionado com dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro em que o utilizador e/ou doente estão estabelecidos.

17. Informações de contacto

Sede da empresa

Associates of Cape Cod, Inc.

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

Tel: (888) 395-2221 ou (508) 540-3444 • Fax: (508) 540-8680

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

Reino Unido

Associates of Cape Cod Int’L, Inc.

Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Reino Unido

Tel: (44) 151–547–7444 • Fax: (44) 151–547–7400

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

Europa

Associates of Cape Cod Europe GmbH

Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Alemanha

Tel: (49) 61 05–96 10 0

18. Historial de revisões

Rev 0 a 11: Alteração de testes em triplicado para duplicado. Substituição de água de grau reagente por água de grau reagente para LAL. Combinação dos componentes KCl e KOH na solução de pré-tratamento alcalina. Retirada da microplaca do kit, passando a item necessário, mas não fornecido. Alteração do mandatário na CE e adição do promotor australiano. Pequenas clarificações, formatação, adição de símbolos, substâncias interferentes adicionais. Rev. 12: Removiudo REP CE Emergo Europe.

19. Bibliografia

- Odabasi, Z., Piatnick, 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.
- 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.

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 Ananiss, 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., Grunlich, D.E., Kerkering, T.M., Brandt, M.E., and Park, B.J. Utility of (1→3)β-D-glucan testing for diagnostics and monitoring response to treatment during the multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. J. Clin. Microbiol. 2015; 53:618-25.

14. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2004. β-Glucan as a diagnostic adjuvant for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. CID 39: 199-205.

15. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. Thrombosis Res. 68: 1-32.

16. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumuraya, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (1→3)-β-D-Glucaens. 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* ameocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.

18. Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and Saito, H. 1993. Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-β-D-Glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.

19. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. Kidney International 60: 319-323.

20. Kato, A., Takita, T., Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-β-D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.

21. Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishina, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakut, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauge types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.

22. Mohr, J., Piatnick, 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) [CAAG 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. Racl, Z., Kocmanova, I., Lengrova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timislina, S., Kunishina, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakut, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauge types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.

27. Posteroar B., De Pascale, G., Tambarello, 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.

28. Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., and Steinbach, W.J. 2007. (1→3)-β-D-Glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-glucan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924-925.

29. Goudjil, S., Kongolo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. J. of 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., Saeki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical evaluation of the (1→3)-β-D-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. Clin. Inf. Dis. 41: 299-305.

32. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntzirza F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2011; 52:750-70.

33. Hou TY, Wang SH, Liang SX, Jiang WX, Luo DD, Huang DH. The Screening Performance of Serum 1,3-Beta-D-Glucan in Patients with Invasive Fungal Diseases: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. PLoS One. 2015 Jul 6;10:e0131602.

34. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O. β-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633-43.

35. Onishi A1, Sugiyama D, Kogata Y, Saegusa J, Sugimoto T, Kawano S, Morinobu A, Nishimura K, Kumagai S. Diagnostic accuracy of serum 1,3-β-D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol. 2012; 50:7-15.

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

37. He S¹, Hang JP¹, Zhang L², Wang F², Zhang DC², Gong FH² A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3-β-d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. J Microbiol Immunol Infect. 2015 Aug;48:351-61.

38. Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the *Limulus* Amebocyte Lysate Assay and Role of (1→3)-β-D-Glucan. PLoS One. 2016 Oct 20;11(10):e0164978. doi: 10.1371/journal.pone.0164978. eCollection 2016.

39. Finkelman M. Specificity Influences in (1→3)-β-d-Glucan-Supported Diagnosis of Invasive Fungal Disease. J Fungi (Basel) 2020 Dec 29;7