

Analys av (1→3)-β-D-glukan i serum

FUNGITELL® ANALYS

Bruksanvisning



**ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED**

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

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


Konly

IVD

42

CE

PN001268-sv Rev12
REF FT001
2023-06-13

 På www.acciusa.com finns bruksanvisningar på ditt språk.
Denna produkt är endast för in vitro-diagnostisk användning och professionellt bruk.

1. Avsedd användning

Fungitell®-analysen är en proteas-zymogen-baserad kolorimetrisk analys för kvalitativ detektion av (1→3)-β-D-glukan i serum hos patienter med symptom på, eller med medicinska tillstånd som predisponerar patienten för invasiv svampinfektion. Serumkoncentrationen av (1→3)-β-D-glukan, en viktig cellväggskomponent hos olika medicinskt viktiga svampar¹, kan användas som hjälpmedel för att diagnostisera djupliggande mykoser och fungemier². Ett positivt resultat visar inte vilken klass av svampar (fungi) som kan orsaka infektionen.

(1→3)-β-D-glukan-titrar ska användas i kombination med andra diagnostiska procedurer, t.ex. mikrobiologisk odling, histologisk undersökning av biopsiprover och radiologisk undersökning.

Viktigt

Ge denna information till beställande läkare: *Vissa svampar, t.ex. klassen Cryptococcus, som producerar väldigt låga nivåer av (1→3)-β-D-glukan, har eventuellt inte tillräckligt höga nivåer av (1→3)-β-D-glukan i serum för att kunna detekteras av analysen*^{3,4}. *Infektioner med svamp av ordningen Mucorales, t.ex. Absidia, Mucor och Rhizopus*^{5,4} *som såvitt känt inte producerar (1→3)-β-D-glukan, har också observerats ge låga titrar av (1→3)-β-D-glukan i serum. Dessutom producerar Blastomyces dermatitidis i jästfasen lite (1→3)-β-D-glukan som eventuellt inte detekteras av analysen*⁶.

Inkludera detta meddelande vid rapportering av Fungitell®-analysens testresultat.

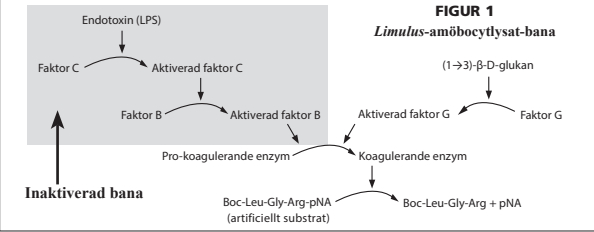
2. Sammanfattning och förklaring

Förekomsten av svampinfektioner med opportunistiska patogener ökar, särskilt hos patienter med nedsatt immunförsvar^{6,7,9}. Invasiva svampsjukdomar, som opportunistiska infektioner, är vanliga bland patienter med hematologiska sjukdomar och AIDS och står för ett växande antal nosokomiala infektioner, i synnerhet bland organmottagare och andra patienter som får immunsuppressiva behandlingar^{8,10}. Många svampsjukdomar förvärvas via inandning av svampsporer som härrör från jord, växtavfall, luftkonditioneringsystem och/eller exponerade ytor. Vissa opportunistiska svampar förekommer i/på människans hud, tarmkanal och slemhinnor^{11,12}. Diagnos på invasiva mykoser och fungemier grundas vanligtvis på icke-specifika diagnostiska eller radiologiska metoder. Nyligen har biologiska markörer av svampinfektioner lagts till de tillgängliga diagnostiska metoderna³.

Opportunistiska svamppatogener innefattar *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*, *Exserohilum rostratum* och *Pneumocystis jirovecii*. Den (1→3)-β-D-glukan som produceras av dessa organismer och andra, kan detekteras med Fungitell®-analysen^{1,8,13,14}.

3. Princip för förfarandet

Fungitell®-analysen mäter (1→3)-β-D-glukan. Analysen baseras på en modifiering av banan för *Limulus*-amöbocytlisat (LAL)^{15,16,17,18}. Figur 1. Fungitell®-reagensen är modifierad för att eliminera bakteriell endotoxinreaktivitet och på så sätt endast reagera på (1→3)-β-D-glukan via den faktor G-medierade sidan av banan. (1→3)-β-D-glukan aktiverar faktor G, ett serinproteaszymom. Den aktiverade faktom G omvandlar det inaktiva förkoagulerande enzymet till det aktiva koagulerande enzymet, vilket i sin tur avskiljer pNA (paranitroanilid) från det kromogena peptidsubstratet, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA och skapar en kromofor, paranitroanilin som absorberas vid 405 nm. Fungitell® kinetisk analys, som beskrivs nedan, är baserad på bestämningen av frekvensen av optisk densitetsökning som produceras av ett prov. Denna frekvens tolkas mot en standardkurva för att producera uppskattningar av koncentrationen av (1→3)-β-D-glukan i provet.



4. Material som medföljer Fungitell®-satsen

Fungitell®-satsen är avsedd för in vitro-diagnostisk användning. Följande material medföljer varje sats och räcker för att analysera 110 brunnar på två mikrotiterplattor (55 brunnar på varje):

- Fungitell®-reagens, en frystorkad (1→3)-β-D-glukanspecifik LAL (två ampuller). *Fungitell®-reagensen består av Limulus (dvs. dolksvans), amöbocytlisat och Boc-Leu-Gly-Arg-pNA kolorimetriskt substrat. Den innehåller inte proteiner från människa eller däggdjur.*
- Pyrosol®-rekonstitutionsbuffert (två ampuller). Ytterligare ampuller med Pyrosol-rekonstitutionsbuffert (katalognr. BC051) kan köpas separat. *Den består av 0,2 M Tris-buffert.*
- Glukanstandard, frystorkad (1→3)-β-D-glukan från Pachyman (två ampuller). *Volymen reagensvatten som ska tillsättas anges på ampullens märkning. Den kalibreras mot en intern referensstandard.*
- LAL reagensvatten (LRW) (två flaskor)
- Obs!** 20 ml reagensvatten för laboratoriebruk (RGW) och LRW i glasampuller är ekvivalenta.
- Alkalisk förbehandlingslösning (två ampuller) som innehåller *0,125 M KOH* och *0,6 M KCl*

Allt ovanstående material, med undantag för standarden, är fria från interfererande nivåer av (1→3)-β-D-glukan.

5. Material som krävs men som inte medföljer

- Allt material måste vara fritt från interfererande glukan.
- Pipettspetsar* (250 µL - kat.nr. PPT25, 1 000 µL - kat.nr. PPT10)
 - Pipetter som klarar att tillföra volymer på 5–25 µL och 100–1 000 µL
 - Repetitiv pipett med sprutspetsar, som klarar att tillföra 100 µL
 - Provrör* för preparering av standardserie (kalibreringskurva) och kombination av serumbehandlingsreagenser (12 x 75 mm - kat. nr. TB240 eller 13 x 100 mm - kat.nr. TB013)
 - Inkuberingsplattläsare (37 °C) som klarar avläsning vid 405 nm (helst dubbel våglängdsmonitorering, vid både 405 och 490 nm) med ett dynamiskt intervall på åtminstone 2,0 absorbanseheter, ansluten till lämplig datorbaserad programvara för kinetisk analys.
 - Sterila, glukanfria rör för alikvotering av prover. Rör som är certifierade som RNase, DNase och icke-pyrogena kan användas.
 - Parafilm®
 - Mikroplattor med 96 brunnar* **Obs!** Fungitell®-analysen har validerats med plattor som har följande egenskaper: av polystyren, sterila, obelagda, med platt botten, fria från interfererande betaglukan enligt ACC:s specifikationer och individuellt inpackade.

* Dessa produkter, som tillhandahålls av Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), är certifierat fria från interfererande glukaner.

6. Reagensförvaring

- Förvara alla reagenser mörkt i leveranskick vid 2–8 °C.
- Rekonstituerat Fungitell®-reagens ska förvaras vid 2–8 °C och användas inom 2 timmar. Alternativt kan rekonstituerat Fungitell®-reagens frysas vid -20 °C i upp till 20 dagar, tinas en gång och användas.

7. ⚠ Varningar och försiktighetsåtgärder

- Pipettera inte något material med munnen. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagens hanteras.
- Följ verk samma och lokala säkerhetsbestämmelser.
- Använd skyddshandskar när du hanterar biologiska prover som kan vara smittsamma eller farliga. De handskebeklädda händerna ska anses som kontaminerade hela tiden, håll dina handskebeklädda händer borta från ögon, mun och näsa. Använd ett ögonskydd och skyddsmask om det finns en möjlighet för aerosolkontaminering.
- Obs!** Använd inte satsler med skadat innehåll.
- Kassering: Rester av kemikalier och prepareringar ska i allmänhet anses vara farligt avfall. Kassering av denna typ av avfall regleras i nationella och regionala lagar och förordningar. Kontakta din lokala myndighet eller avfallhanteringsföretag för råd om kassering av farligt avfall.
- Säkerhetsdatabladet** för alla Fungitell®-satskomponenter kan laddas ner från ACC webbsida: www.acciusa.com.

7.1 Försiktighetsåtgärder för procedur

Fungitell®-analysen kräver rigorös uppmärksamhet på teknik och testmiljö. Grundlig utbildning av teknikern om analysmetoden och om undvikande av kontamination är avgörande för analysens effektivitet.

- Använd god laboratorie sed enligt de lokala förordningarna. Denna analys är känslig mot kontamination och felaktig pipettering.

- Etablera en ren miljö i vilken analysen utförs.
- Notera att glukän såväl som svampartikelkontamination från den mänskliga kroppen, kläder, behållare, vatten och luftburet damm kan orsaka interferens för Fungitell®-testet.
- Möjliga kontamineringskällor: cellulosa material som gasväv, pappersservetter och kartong, glaspipetter med bomullskorkar och pipettspetsar med cellulosa filter. Kirurgiska gasbindor och svampar kan också utsöndra stora mängder av (1→3)-β-D-glukan^{21,22}. Se avsnittet Testets begränsningar för andra patientrelaterade kontaminationskällor.
- Använd inte material efter utgångsdatumet.

7.2 Provhantering

- Blodprovstagnig och preparering av serum ska utföras enligt tillämpliga, lokala förordningar. Provtagnig: Blodproverna tappas i sterila serumprepareringsrör eller serumsepareringsrör (SST) för preparering av serum.
- Provförvaring: Serumprover kan förvaras vid 2–8 °C i upp till 15 dagar, eller frysas vid -20 °C i upp till 27 dagar eller -80 °C i upp till fyra år.
- Provmärkning: Prover ska märkas tydligt enligt institutionens vedertagna praxis.

8. Förfarande

8.1 Instrumentinställning och testprogrammering

Inställningar kan variera med olika instrument och programvaror. I allmänhet gäller följande: Ställ in programvaran för plattläsaren så att data insamlas i Vmean-läget. Kontrollera i handboken till programvaran att inställningarna är korrekta för att garantera att det beräknade värdet är medelfrekvensen för optisk densitetsförändring för samtliga insamlade datapunkter. Ställ in intervallert mellan instrumentavläsningar på det minsta värde som programvaran/instrumentet tillåter under testets 40-minutersperiod. Programvarans våglängdsinställningar ska vara 405 nm minus bakgrunden på 490 nm. Det rekommenderas att båda våglängderna används men om dubbel våglängdsavläsning inte är tillgänglig ska du läsa av testet vid 405 nm och undersöka varje patientprovs kinetiska kurva efter tecken på interferens (se avsnitt 9.0 för mer information). Inkubationstemperaturen ska ställas in på 37 °C. Ställ in blandning/plattskakning på att utföras 5–10 sekunder innan avläsningen inleds. Kurvanpassningsinställningen ska vara "linjär/linjär" eller motsvarande. Avläsning ska påbörjas utan någon fördröjningstid.

8.2 Beredning av glukansstandard som medföljer satsen.

- Lös upp en ampull med glukansstandard med den volym LRW som anges på ampullen så att du får en lösning med 100 pg/ml. Vortexblanda i minst 30 sekunder med medel till medelhög hastighet för att rekonstituera standarden (lösning 1). Förvara glukanolösningen vid 2–8 °C och använd den inom tre dagar. Steg b–e nedan visar ett exempel på ett schema för preparation av standardkurva.
- Bered en standard med 50 pg/ml (lösning 2) genom att blanda 500 µL LRW och 500 µL av lösning 1 i ett glukanfritt rör (lösning 2). Vortexblanda i minst 10 sekunder.
- Bered en standard med 25 pg/ml (lösning 3) genom att blanda 500 µL LRW och 500 µL av lösning 2 i ett glukanfritt rör (lösning 3). Vortexblanda i minst 10 sekunder.
- Bered en standard med 12,5 pg/ml (lösning 4) genom att blanda 500 µL LRW och 500 µL av lösning 3 i ett glukanfritt rör (lösning 4). Vortexblanda i minst 10 sekunder.
- Bered en standard med 6,25 pg/ml (lösning 5) genom att blanda 500 µL LRW och 500 µL av lösning 4 i ett glukanfritt rör (lösning 5). Vortexblanda i minst 10 sekunder.

8.3 Öppna den alkaliska förbehandlingslösningen.

Den alkaliska förbehandlingslösningen omvandlar trippelspiralglukaner till ensträngade glukaner^{17,18}, som är mer reaktiva i analysen. Det alkaliska pH-värdet inaktiverar dessutom serumproteaserna och hämmarna som kan störa analysen.²⁴

Kassera ampullen (enligt laboratoriets rutiner) om den inte ska användas i ett efterföljande test. I detta fall täcks den över med Parafilm, med användning av den sidan av Parafilmen som var riktad mot pappersbaksidan.

8.4 Ställa in mikrotiterplatta

Ställ in upplägget för mikrotiterplattan i programvaran med standarderna (Std), negativa kontroller (Neg) och 21 prover (Spl). Följande upplägg rekommenderas:

	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												

Ange standardkoncentrationerna i programvaruinställningarna som 500, 250, 125, 62,5 respektive 31 pg/ml.

Observera att de standardkoncentrationer som angivits är fem gånger större än de som beretts i avsnitt 8.2 ovan. Detta beror på att standardvolymen som används i analysen är 25 µL per brunn vilket är fem gånger serumprovets volym (se avsnitt 8.5 b. nedan). Således blir serumprovet femfaldigt effektivt utspätt relativt till standarden. Multiplicering av standardkoncentrationerna med fem kompenserar för denna utspädning.

Obs! De yttre brunnarna kan användas, om det har påvisats att de yttre brunnarnas prestanda är jämförbar med prestandan för de inre brunnarna.

Obs! De negativa kontrollerna används inte i standardkurvan.

8.5 Tillsats av serum och alkalisk förbehandlingslösning.

- Tina frysta serumprover i rumstemperatur. Vortexblanda alla prover väl – i minst 30 sekunder på medium till medium-hög hastighetsinställning.
- Överför 5 µL av serumprovet till respektive betecknade brunnar (UK) i minst duplikat. Upprepa för varje serumprov.
- Tillsätt 20 µL av den alkaliska förbehandlingslösningen i varje brunn som innehåller serum. Se till att serumet och förbehandlingsdropparna kommer i kontakt med varandra. Obs: Steg b och c kan utföras i omvänd ordning enligt teknikerns preferens. Obs: För att undvika oavsiktlig kontamination ska du sätta tillbaka locket över mikroplattan när du tillsatt prover och reagens i brunnarna.
- Skaka plattan i 5–10 sekunder för att blanda brunnens innehåll väl (avläsarens plattskakningsfunktion kan användas) och inkubera sedan i 10 minuter vid 37 °C i inkubationsplattläsaren.

8.6 Rekonstitution av Fungitell®-reagens.

Obs: Detta är praktiskt att utföra medan förbehandlingsinkubationen pågår. Konsekvent vad av tidpunkt för rekonstitution förbättrar reproducerbarheten eftersom Fungitell®-reaktionen börjar vid rekonstitutionen, även om det sker på en låg nivå.

Rekonstituera en ampull med Fungitell®-reagens genom att tillsätta 2,8 ml LRW och sedan tillsätta 2,8 ml Pyrosol-rekonstitutionsbuffert med 1 000 µL-pipetten. Täck ampullen med Parafilm och använd Parafilm-sidan som var riktad mot pappersbaksidan. Snurra runt ampullen försiktigt för att lösa upp det helt – vortexblanda inte.

8.7 Tillsats av negativa kontroller och glukansstandarder.

När serumförbehandlingsinkubationen (avsnitt 8.5 d.) är klar tar du bort plattan från inkubationsplattläsaren och tillsätter standarderna och negativa kontroller till plattan. Rekommenderat mönster för standardkoncentration:

- Tillsätt 25 µL LRW till brunn G2 och G3.
- Tillsätt 25 µL av 6,25 pg/ml-standardlösningen 5 till brunn F2 och F3, märkta som 31,25 pg/ml.
- Tillsätt 25 µL av 12,5 pg/ml-standardlösningen 4 till brunn E2 och E3, märkta som 62,5 pg/ml.
- Tillsätt 25 µL av 25 pg/ml-standardlösningen 3 till brunn D2 och D3, märkta som 125 pg/ml.
- Tillsätt 25 µL av 50 pg/ml-standardlösningen 2 till brunn C2 och C3, märkta som 250 pg/ml.
- Tillsätt 25 µL av 100 pg/ml-standardlösningen 1 till brunn B2 och B3, märkta som 500 pg/ml.

8.8 Procedur vid tillsats av Fungitell®-reagens och plattinkubation.

- Tillsätt 100 µL Fungitell®-reagens till varje brunn (innehållande negativa kontroller, standarder och prover) med hjälp av stepper-pipetten (repetitiva pipetten).
- Sätt in plattan i mikroplattläsaren (utjämnad till 37 °C), ta av locket och skaka i 5–10 sekunder.

Läs av plattan **utan locket** vid 405 nm minus 490 nm, i 40 minuter vid 37 °C. Obs! Om instrumentet inte ger tid för att ta av locket mellan skakning och avläsning, skaka med avtaget lock för att säkerställa avläsning utan lock.

9. Beräkna resultaten.

Samla in data och analysera på följande sätt: Undersök kinetiska diagram i testerna och kontrollera för mönster som inte visar en jämn ökning som är jämförbar med de hos standarderna. Invalidera förändringar som indikerar optisk interferens (t.ex. deras kinetiska mönster följer inte standardernas). Räkna ut medelfrekvensen för optisk densitetsförändring (milliabsorbansheter per minut) för alla punkter mellan 0 och 40 minuter (utförs av programvaran). Interpolera provets koncentrationer av (1→3)-β-glukan från standardkurvan (utförs av programvaran).

10. Kvalitetskontroll

- Korrelationskoefficienten (r) för standardkurvan (linjär mot linjär) ska vara ≥0,980.
- Brunnarna med 25 µL LRW är de negativa kontrollerna. Negativa kontroller ska ha frekvensresultat (t.ex. milliabsorbansheter per minut) som är mindre än 50 % av de lägsta standardfrekvenserna. Om inte, så måste analysen upprepas med alla nya reagens.
- Hantera komplexa prover. Om analytikern observerar ovanlig kinetik i ett test av ett prov, t.ex. ett prov som är mjölkigt, missfärgat eller grumligt (t.ex. sådana som är kraftigt hemolyserade, lipemiska eller som innehåller överskott på bilirubin) måste provet spädas med LRW och testas igen. Spädningen måste räknas in i rapporteringen av resultat genom att resultatet multipliceras med spädningsfaktorn. **I typfallet skrivs spädningsfaktorn in i programvaruinställningen för provet och korrigeringen görs då automatiskt.**

Obs!

- Alla användare av testet ska etablera ett kvalitetskontrollprogram för att försäkra sig om att testet utförs korrekt enligt gällande bestämmelser på plats.
- Det rekommenderas att testa serumkontrollprover (negativa, nära gränsvärdet eller starkt positiva) i sammanhanget av ytterligare laboratoriekontroller och god laboratoriesed. Dessa ingår inte i Fungitell®-satsen.

11. Tolkning av resultat
NEGATIVT RESULTAT
(1→3)-β-D-glukan-värden <60 pg/ml tolkas som negativa resultat.

Laboratoriet som utför testet ska informera den beställande läkaren om att inte alla svampinfektioner resulterar i förhöjda nivåer av (1→3)-β-D-glukan i serum. Vissa svampar, t.ex. klassen Cryptococcus3,4 producerar mycket låga nivåer av (1→3)-β-D-glukan. Mucorales, t.ex. *Absidia*, *Mucor* och *Rhizopus*^{1,4} är inte kända för att producera (1→3)-β-D-glukan. På liknande sätt producerar *Blastomyces dermatitidis*, i dess jästfas, föga (1→3)-β-D-glukan och blastomykopatienter har vanligen ej detekterbara nivåer av (1→3)-β-D-glukan i Fungitell®-analysen⁵.

OSÅKERT RESULTAT

Värden från 60 till 79 pg/ml anses vara ofullständiga. Ytterligare provtagning och testning av sera rekommenderas. Frekvent provtagning och testning förbättrar användbarheten för diagnos.

POSITIVT RESULTAT

(1→3)-β-D-glukan-värden ≥80 pg/ml tolkas som ett positivt resultat. Ett positivt resultat definierar inte förekomsten av sjukdom och ska användas tillsammans med andra kliniska fynd för att fastställa en diagnos.

12. Testets begränsningar

- Vävnadsställen med svampinfektion¹⁰, inkapsling, samt mängden av (1→3)-β-D-glukan som produceras av vissa svampar kan påverka serumkoncentrationen av denna analyt. Reducerad förmåga att föra ut (1→3)-β-D-glukan i blodmottopet kan minska förmågan att detektera vissa svampinfektioner.
- Vissa individer har förhöjda nivåer av (1→3)-β-D-glukan som hamnar inom den obestämda zonen. I sådana fall rekommenderas ytterligare övervakande testning.
- Frekvensen av patienttestning beror på den relativa risken för svampinfektion. Provtagningsfrekvenser på minst två till tre gånger per vecka rekommenderas för riskpatienter.
- Positiva resultat har hittats hos hemodialyspatienter^{19,20,38}, patienter som behandlats med vissa fraktionerade blodprodukter såsom serumalbumin och immunglobuliner^{23,25} samt i prover eller hos patienter som exponerats för gasväv och kirurgiska svampar som innehåller glukän. Patienter behöver 3–4 dagar för att återställa baslinjenivåerna av (1→3)-β-D-glukan i serum efter kirurgisk exponering för svampar och gasväv som innehåller (1→3)-β-D-glukan^{21,22}.
- Ta detta med i beräkningen vid tidsanpassningen av provtagning på kirurgipatienter.
- Prover som erhållits genom stick i hålen eller fingret är oacceptabla eftersom den alkoholintränkta gassudd som används för att preparera stickstället (och, potentiellt, blodansamling på huden) har visat sig kontaminera proverna. I hittills utförda studier har inga skillnader observerats mellan prover som tagits via slang eller venpunktion^{26,27}.
- För en omfattande granskning av faktorer som bidrar till falska positiva 1→3)-β-D-glukan, se Finkelman, M.A., Journal of Fungi (2021)⁹.
- Testnivåer fastställdes på vuxna patienter. Normala nivåer och gränsvärdesnivåer för spädbarn och barn är under utredning^{28,29}.

13. Prestandaegenskaper

13.1 Gränsvärde och förväntade värden

En prospektiv multicenterstudie³¹ utfördes för att fastställa den diagnostiska sensitiviteten och den diagnostiska specificiteten för Fungitell®-analysen (se jämförande testning nedan) har visat att betaglukanvärden är förhöjda vid olika svampinfektioner. När tecken och symptom förekommer vid nivån 80 pg/ml eller högre, så varierar det prediktiva värdet för att patienten är positiv för en svampinfektion från 74,4 till 91,7 %. I frånvaro av tecken och symptom vid mindre än 60 pg/ml varierade de negativa prediktiva värdena från 65,1 till 85,1 %.

13.2 Klinisk prestanda

En prospektiv multicenterstudie utfördes för att validera prestandaegenskaperna för Fungitell®-analysen³¹. Testet jämfördes med andra standardmetoder för detektion, (dvs. blododling, histopatologisk undersökning av biopsiprov och radiologiska tecken) avseende mykoser och fungemier.

Trehundrafemtionio (359) patienter testades med analysen. Ett enstaka prov togs från varje patient. I gruppen med lägriskpatienter ingick till synes friska individer och sådana patienter som lagts in på klinikerna av andra orsaker än svampinfektioner. Patientperiodiseringen utfördes vid sex kliniker i USA. Fyra av klinikerna utförde analysen och testade totalt 285 prover. ACC testade alla 359 proverna två gånger men använde endast den andra uppsättningen resultat för att fastställa analysens prestanda. Resultaten från den andra analysuppsättningen skilde sig inte statistiskt från den första uppsättningen.

- Diagnostisk sensitivitet** Sensitiviteten för hela patientpopulationen (359) inklusive cryptococcospatienter var 65,0 % ((60,1–70,0 % 95 % konfidensintervall (CI))(tabell 1).
- Diagnostisk specificitet** Specificiteten var 81,1 % (77,1–85,2 % CI). När de 170 personerna som var negativa för svampinfektion och uppenbarligen friska individer analyserades, var specificiteten 86,5 % med analysen (82,8 %–90,1 % C.I.). När de ytterligare 26 patienterna som var negativa för svampinfektion men hade andra sjukdomar inkluderades observerades en specificitet på 81,1 % (77,1–85,2 % CI).

Tabell 1	ACC-testresultat vid gränsvärdenivå 60-80 pg/ml efter klinik							
Klinik	Bevisad/sannolik Sensitivitet ≥80pg/ml			Specificitet <60pg/ml			Totalt	
	Pos/klin. pos	Sensitivitet	Positivt prediktivt värde	Neg/klin. neg	Specificitet	Negativt prediktivt värde		
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	E/T	0/0	E/T	0,0	0	1
Totalt	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

När resultaten som erhöills från ACC (359 prover) och från klinikerna (285 prover) jämfördes med klinisk diagnos, är sensitiviteten 64,3 % (58,8–69,9 % CI) för ACC och 61,5 % (55,9–67,2 % CI) för klinikerna. Specificiteten är 86,6 % (82,7–90,6 % CI) för ACC jämfört med 79,6 % (74,9–84,3 % CI) för klinikerna

Candidiasis

Det fanns 107 patienter som diagnosticerades positiva för candidiasis i den prospektiva studien. 83 av 107 var positiva med Fungitell®-analysen.

Etthundrasjuttiofem candidiasis-biblioteksprover levererades till Associates of Cape Cod, Inc. 145 av de 175 proverna var positiva enligt analysen.

Aspergillosis

Totalt 10 patienter var positiva för aspergillosis. 8 av 10 var positiva med analysen.

Fusariosis

Tre patienter var positiva för fusariosis. 2 av 3 var positiva med analysen.

Behandling med antimykotikum

Förekomsten eller frånvaron av antimykotisk läkemedelsbehandling hade ingen statistisk signifikant effekt på analysens sensitivitet. 118 personer visades vara positiva för invasiv svampinfektion och fick antimykotisk behandling. 82 var positiva med analysen (sensitivitet, 69,5 %; 61,2 %–77,8 % CI). Dessutom visades tjugofyra (24) patienter vara positiva, men fick inte någon antimykotisk behandling. 18 var positiva med analysen (sensitivitet, 75 %; 57,7 %–92,3 % CI).

13.3 Testkorrelationer

Fyra av klinikerna analyserade totalt 285 prover. Kliniktestresultaten korrelerade kvantitativt vid 96,4 % med resultaten från Associates of Cape Cod, Inc. Korrelationerna för Associates of Cape Cod, Inc. med de olika testklinikerna varierade från 90,6 till 99,2 %.

13.4 Precision

Fungitell®-analysen utvärderades för precision (dvs. upprepningsbarhet och reproducerbarhet) med tio (10) olika prover som testades vart och ett vid tre testkliniker, på tre olika dagar. Analysvariationen mellan laboratorier sträckte sig från 0,9 % till 28,9 % och funderage som ett mått på upprepningsbarhet. Analysvariationen mellan laboratorier sträckte sig från 3,9 % till 23,8 % och funderage som ett mått på reproducerbarhet. De fyra (4) negativa proverna uteslöts från båda analyserna.

13.5 Mätintervall och linjäritet

Resultaten uttrycks i pg/ml serum och omfattar icke-detekterbart (<31 pg/ml) till >500 pg/ml och skrivs ut av programvaran eller avläses från standardkurvan. Korrekta värden över 500 pg/ml kräver att provet späds med LAL-reagensvatten och testas igen. Som anges i kvalitetskontrollansvittet, ska korrelationskoefficienten (r) för standardkurvan (linjär kontra linjär) som täcker mätintervallt för Fungitell®-analysen vara ≥0,980 och de negativa kontrollerna ska ha frekvensvärden (t.ex. milliabsorberande enheter per minut) mindre än 50 % av den lägsta standardfrekvensen. Om inte, så måste analysen upprepas med alla nya reagens.

13.6 Störande substanser

Följande provförhållanden kan ge interferens för ett korrekt resultat av Fungitell®-analysen:














- Missfärgade eller grumliga prover, t.ex. sådana som är kraftigt hemolyserade, lipemiska eller som innehåller överskott på bilirubin, kan orsaka optisk interferens för analysen. Om sådana prover testas, ska testresultaten undersökas avseende tecken på optisk interferens och/eller onormala kinetiska kurvmonöter.

- Förhöjda nivåer av immunoglobulin G, som kan förekomma i serum på grund av multipla myelom, kan resultera i utfällning i reaktionsblandning vid tillsats av Fungitell® till förbehandat serum³⁰.
- Då detta skrevs hade ingen aktiverande faktor G ((1→3)-β-glukan detektionselement) av Fungitell®-reagensen beskrivits som annan än (1→3)-β-glukan. I vissa studier, där påståenden om korsreaktivitet gjorts, har behandling av det troliga aktiverande materialet med renat (1→3)-β-glukanas eliminerat signalen, vilket visar att den observerade aktiveringen berott på kontaminerande ((1→3)-β-glukan³). Kontaminering med serinproteas kan också resultera i para-nitroanilimutsläpp i Fungitell®-reaktionsblandningar, men dessa inaktiveras som en del av förbehandlingsprocessen.

14. Meta-analyser

Utöver detta har flera vetenskapligt granskade studier som publicerats i ämnet (1→3)-β-D-glukan i serum-baserat stöd vid diagnos av invasiv svampsjukdom som innefattar meta-analyser av diagnostiska prestanda^{12,34,35,36,37}.

15. Symbolförklaring

	"Används senast"		"Se bruksanvisningen"
	"Innehåller tillräckligt med material för 'N' tester"		"Behörig representant"
	"Satskod"		"CE-märkning"
	"Medicinsk enhet för in vitro-diagnostik"		"Endast receptbelagd"
	"Katalognr."		"Var försiktig"
	"Temperaturbegränsning"		"Håll borta från solljus"
	"Tillverkare"		

16. Auktoriserade representanter

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

Obs!Allvarliga tillbud som har inträffat i relation till produkten ska rapporteras till tillverkaren och den behöriga myndigheten i den medlemsstat där användaren och/eller patienten har sin hemvist.

17. Kontaktinformation

Företagets huvudkontor

Associates of Cape Cod, Inc.

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

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

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

Storbritannien

Associates of Cape Cod Int’l, Inc.

Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool L33 7RX, Storbritannien

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

E-post: info@accuik.co.uk • www.accuik.co.uk

Europa

Associates of Cape Cod Europe GmbH

Opelstrasse 14, D-64546 Mörfelden-Walldorf, Tyskland

Tel: (49) 61 05–96 10 0

18. Revisionshistorik

Rev 0 till 11: Ändrade triplikat till duplikat testning. Bytte ut reagensvatten för laboratoriebruk till LAL-reagensvatten. Kombinerade KCL- och KOH-komponenter till alkalisk förbehandlingslösning. Tog bort mikroplatta från sats och erbjudande som artikel som krävs men inte medföljer. Ändrade EG-representant och lade till sponsor från Australien. Mindre tydliggöranden, formatering, tillägg av symboler, ytterligare interfererande ämnen. Rev 12: EG-representant Emergo Europe borttagen.

19. Referenser

- 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. Mucomycosis – 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.
- 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 Anaisie, 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., Grgurich, D.E., Kerkering, T.M., Brandt, M.E., and Park, B.J. Utility of (1→3)-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.
- 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.
- Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph 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-Glucans. 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 115:683-686.
- 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.
- 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., Ameiku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kurishima, H., Yaku, K., Kakei, K., Hirakata, Y., and Kakei, M. 2009. Measurement for (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauze types. Tohoku J. Exp. Med. 217: 117-121.
- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
- 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., Kočanovaa, I., Lengerova, M., Weinbergerova, B., Buresova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timilsina, S., Rodriguez, J., 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.
- Posteriori, 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.
- 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-galucan test in children. Clin. Vaccine Immunol. 14: 924-925.
- Goudjil, S., Kongofo, G., Dusol, L., Imestourts, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)-β-D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. J. of Materernal-Fetal and Neonatal Med. 26: 44-48.
- 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.
- 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 G. β-D-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 (ECL-3). Clin Infect Dis. 2012; 54:633-43.
- Onishi A, 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, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of β-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19:39-49.
- He S¹, Hang JP², 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.
- 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 β-(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

Ytterligare referenser finns på vår webbsida Fungitell.com

A Testprocedur snabbguide kan laddas ner från webbsidan Fungitell.com: https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf