




<b>Analys av (1→3)-β-D-glukan i serum</b>	
<b>FUNGITELL® ANALYS</b>	
<b>Bruksanvisning</b>	
	Telefon: (508) 540-3444 Kostnadsfritt: (888) 395-2221 Fax: (508) 540-8680 Teknisk support: (800) 948-3248 Kundservice: (800) 525-8378
R <sub>only</sub> IVD 	

PN001268-sv Rev13 REF FT001

2024-09-05



På www.acciusa.com finns bruksanvisningar på ditt språk.

*Denna produkt är endast för diagnostisk in vitro-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 medicniskt viktiga svampar<sup>1</sup>, kan användas som hjälpmedel för att diagnostisera djupliggande mykoser och fungemier<sup>2</sup>. 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.

<p><b>Viktigt</b></p> <p><i>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<sup>3,4</sup>. Infektioner med svampar av ordningen Mucorales, t.ex. Absidia, Mucor och Rhizopus<sup>1,4</sup> 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<sup>5</sup>.</i></p> <p>Inkludera detta meddelande vid rapportering av Fungitell®-analysens testresultat.</p>
---

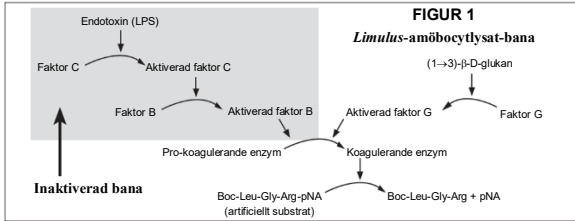
#### 2. Sammanfattning och förklaring

Förekomsten av svampinfektioner med opportunistiska patogener ökar, särskilt hos patienter med nedsatt immunförsvar<sup>6,7,8</sup>. 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<sup>9,10</sup>. Många svampsjukdomar förväras via inandning av svampsporer som härrör från jord, växtavfall, luftkonditioneringssystem och/eller exponerade ytor. Vissa opportunistiska svampar förekommer i/på människans hud, tarmkanal och slemhinnor<sup>11,12</sup>. 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 metoderna<sup>2</sup>.

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<sup>18,13,14</sup>.

#### 3. Princip för förfarandet

Fungitell®-analysen mäter (1→3)-β-D-glukan. Analysen baseras på en modifiering av banan för *Limulus*-amöbocytylsat (LAL)<sup>15,16,17,18</sup>, figur 1. Fungitell®-reagens 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 serinproteaszymogen. Den aktiverade faktorn 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), amöbocytylsat och Boc-Leu-Gly-Arg-pNA kolorimeriskt substrat. Den innehåller inte proteiner från mänskiska 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 reagensvattnen som ska tillsättas anges på ampullens märkning. Den kalibreras mot en intern referensstandard.*
- LAL reagensvatten (LRW) (två flaskor)
- LAL 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 absorbanseenheter, 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, vilka tillhandahålls av Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), är certifierat fria från interfererande glukaner.

#### 6. Reagensförvaring

- Förvara alla reagenser mörkt i leveransskick 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 används.

### 7. ⚠️ Varningar och försiktighetsåtgärder

- Pipettera inte något material med munnen. Undvik att röka, äta eller dricka i områden där prover eller satsreagenser hanteras.
- Följ verksamma och lokala säkerhetsbestämmelser.
- Använd skyddshandskar när du hanterar biologiska prover som kan vara smittsamma eller farliga. De handskbecklädda händerna ska anses som kontaminerade hela tiden, håll dina handskbecklädda händer borta från ögon, mun och näsa. Använd ett ögonskydd och skyddsmask om det finns en möjlighet för aerosolkontaminering.
- Obs!** Använd inte satsr 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.
- Säkerhetsdatabladen** 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 testmiljön. Grundlig utbildning av teknikern om analysmetoden och om undvikande av kontamination är avgörande för analysens effektivitet.

- Använd god laboratoriesed enligt de lokala förordningarna. Denna analys är känslig mot kontamination och felaktig pipettering.
- Etablera en ren miljö i vilken analysen utförs.
- Notera att glukan såväl som svamppartikelkontamination från den mänskliga kroppen, kläder, behållare, vatten och luftburet damm kan orsaka interferens för Fungitell®-testet.
- Möjliga kontamineringskällor: cellulosamaterial som gasväv, pappersservetter och kartong, glaspipetter med bomullskorkar och pipettspetsar med cellulosafilter. Kirurgiska gasbindor och svampar kan också utsöndra stora mängder av (1→3)-β-D-glukan<sup>21,22</sup>. Se avsnittet Testets begränsningar för andra patientrelaterade kontaminationskällor.
- Använd inte material efter utgångsdatumet.

#### 7.2 Provhuntering

- Blodprovstagning och preparering av serum ska utföras enligt tillämpliga, lokala förordningar. Provtagning: Blodproverna kan 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 intervallet 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 glukanstandard som medföljer satsen

- Lös upp en ampull med glukanstandard med den volym LRW som anges på ampullen så att du får en lösning med 100 pg/ml. Vortexblanda i minst 30 sekunder med medium till medium-hög hastighet för att rekonstituera standarden (lösning 1). Förvara glukanlösningen 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<sup>7,19</sup> som är mer reaktiva i analysen. Det alkaliska pH-värdet inaktiverar dessutom serumproteaserna och hämmarna som kan störa analysen.<sup>24</sup>

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	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
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 programvarainställningarna som 500, 250, 125, 62,5 respektive 31 pg/ml. Observera att de standardkoncentrationer som angivts 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 val 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 glukanstandarder

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. Om en plattskakningsfunktion inte är tillgänglig med mikroplattläsaren kan en extern mikroplattskakare användas.

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 förändringar för testprover och kontrollera om det finns 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 (milliabsorbansenheter per minut) för alla punkter mellan 0 och 40 minuter (utförs av programvaran). Interpolera provets koncentrationer av (1→3)-β-D-glukan från standardkurvan (utförs av programmet).



34. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O.  $\beta$ -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.
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- $\beta$ -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, Korbila IP, Zhu YG, Vasileiou VA, Falagas ME. Accuracy of  $\beta$ -D-glucan for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19:39-49.
37. He S1, Hang JP2, Zhang L2, Wang F2, Zhang DC3, Gong FH4. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- $\beta$ -d-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect*; 2015 Aug;48:551-61.
38. Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artifact? Limitations of the Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -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 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -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](https://www.fungitell.com)

En snabbguide för testproceduren kan laddas ned från [Fungitell.com](https://www.fungitell.com)

webbplats på: [https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell\\_ProcedureOutline\\_PR18-016.pdf](https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf)