

Test auf (1→3)-β-D-Glukan in Serum

FUNGITELL®

Gebrauchsanleitung

	ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED	<p>Telefon: +1 508 540-3444</p> <p>Gebührenfrei: +1 888 395-2221</p> <p>Fax: +1 508 540-8680</p> <p>Technischer Kundendienst: +1 800 848-3248</p> <p>Kundendienst: +1 800 525-8378</p>	<p></p> <p>42</p> <p></p>
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536			

PN001268-de

Rev 000 Überarbeitet Dezember 2007

VERWENDUNGSZWECK

Der Fungitell-Test ist ein kolorimetrischer Test auf Basis eines Proteasezymogens für den qualitativen Nachweis von (1→3)-β-D-Glukan im Serum von Patienten mit Symptomen einer invasiven Pilzkrankung bzw. einer medizinischen Erkrankung, die den Patienten für eine invasive Pilzkrankung anfällig macht. Die Serumkonzentration von (1→3)-β-D-Glukan, einem Hauptbestandteil der Zellwand verschiedener medizinisch bedeutsamer Pilze, kann als Hilfsmittel bei der Diagnose tiefsitzender Mykosen und Fungämien herangezogen werden. Ein positives Ergebnis zeigt nicht an, welche Klasse von Pilzen die Infektion verursachen könnte.

Der Test ist für die Verdachtsdiagnose einer Pilzinfektion indiziert. Er sollte in Verbindung mit anderen diagnostischen Verfahren, wie beispielsweise mikrobiologischen Kulturen, der histologischen Untersuchung von Biopsieproben und radiologischen Untersuchungen, angewandt werden.

<p>Wichtig – Es wird empfohlen, folgende Informationen an den anfordernden Arzt weiterzugeben:</p> <p>Der Fungitell-Test kann bestimmte Pilzarten wie beispielsweise die Gattung <i>Cryptococcus</i> (9), die sehr wenig (1→3)-β-D-Glukan produziert, nicht erkennen. Nicht erkannt werden ferner Zygomyceten wie beispielsweise <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> und <i>Rhizopus</i> (17), die bekanntlich kein (1→3)-β-D-Glukan produzieren. Darüber hinaus produziert auch die Hefephase von <i>Blastomyces dermatitidis</i> wenig (1→3)-β-D-Glukan und wird von dem Test gegebenenfalls nicht erkannt (18).</p> <p>Diese Angaben sind den Testergebnissen des Glukantests beizulegen.</p>

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

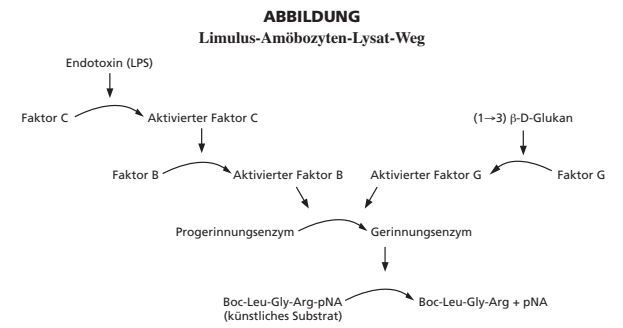
Es ist eine Zunahme der Inzidenz von Pilzinfektionen durch primäre und opportunistische Pathogene festzustellen, vor allem bei immunkomprimierten Patienten (2,3,4). Invasive Pilzkrankheiten wie auch opportunistische Infektionen kommen häufig bei Patienten mit Blutkrebs und AIDS vor und machen eine steigende Anzahl von Nosokomialinfektionen aus, insbesondere bei Empfängern von Organtransplantaten und anderen Patienten, die immunsupprimierende Behandlungen erhalten (1,4). Viele Pilzkrankheiten werden durch Einatmen von Pilzsporen aus der Erde, aus Pflanzendetritus, Luftumwälzungssystemen und/oder exponierten Oberflächen erworben. Einige opportunistische Pilze sind in/auf der Haut des Menschen, im Darmtrakt und auf den Schleimhäuten zu finden (7). Die Diagnose invasiver Mykosen und Fungämien beruht üblicherweise auf unspezifischen diagnostischen oder radiologischen Techniken.

Häufige primäre Pilzpathogene des Menschen sind *Candida* spp. und *Aspergillus* spp.. Opportunistische Pilzpathogene sind unter Anderem *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* und *Pneumocystis carinii*. Der Fungitell-Test dient dem Nachweis des von diesen und anderen Organismen produzierten (1→3)-β-D-Glukans (4,5, 16).

VERFAHRENSPRINZIP

Der Fungitell-Test misst die Konzentration von (1→3)-β-D-Glukan. Der Test beruht auf einer Modifikation des *Limulus*-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Wegs (8-11), Abbildung 1. Das Fungitell-Reagenz ist modifiziert, um Faktor C zu eliminieren, und reagiert daher über die Faktor-G-vermittelte Seite des Wegs nur mit (1→3)-β-D-Glukan.

(1→3)-β-D-Glukan aktiviert den Faktor G, ein Serinproteasezymogen. Der aktivierte Faktor G wandelt das inaktive Progerinnungsenzym zu dem aktiven Gerinnungsenzym um, welches wiederum pNA von dem chromogenen Peptidsubstrat Boc-Leu-Gly-Arg-pNA abspaltet. Dabei entsteht ein Chromophor, der Licht bei 405 nm absorbiert. Der unten beschriebene kinetische Fungitell-Test beruht auf der Bestimmung der Rate des von einer Probe produzierten Anstiegs der optischen Dichte. Diese Rate wird mit Hilfe einer Standardkurve ausgewertet, um Schätzwerte der (1→3)-β-D-Glukankonzentration in der Probe zu erhalten.



MIT DEM FUNGITELL-KIT GELIEFERTES MATERIAL

Das Fungitell-Kit ist ein *In-vitro*-Diagnostikum. Jedes Kit enthält folgende Materialien, die ausreichend sind, um 110 Kavitäten auf zwei Mikrotiterplatten (jeweils 55 Kavitäten) zu messen:

- Fungitell® Reagenz, ein lyophilisiertes LAL, das für (1→3)-β-D-Glukan spezifisch ist (zwei Fläschchen)
- Pyrosol-Rekonstitutionspuffer, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (zwei Fläschchen)
- Glukanstandard, lyophilisiertes Pachyman und inerte Füllsubstanz mit auf dem Etikett angegebener Konzentration von (1→3)-β-D-Glukan (zwei Fläschchen)
- Reinstgüte Wasser (RGW); (zwei Flaschen)
- Pyroplates: Unbeschichtete Flachbodenplatten mit 96 Kavitäten mit Deckel, frei von interferierenden Glukanen (zwei)
- KCl 1,2 M (ein Röhrchen)
- KOH 0,25 M (ein Röhrchen)

Alle oben Genannten, ausgenommen die Standardlösung, sind frei von interferierenden Mengen an (1→3)-β-D-Glukan.

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

Alle Materialien müssen frei von interferierendem Glukan sein. Glasgegenstände müssen bei mindestens 235°C in trockener Hitze für 7 Stunden (oder mit einem geprüften äquivalenten Verfahren) entpyrogeniert sein, um für den Gebrauch infrage zu kommen.

- Pipettenspitzen* (250 µL - Cat# PPT25, 1000 µL - Cat# PPT10)
- Pipetten zur Abgabe von Volumina von 5-25 µL und 100-1000 µL
- Stepper-Pipette mit Spritzenspitzen zur Abgabe von 100 µL
- Teströhrchen* zur Herstellung der Standardreihe und zur Kombination der Reagenzien zur Serumbehandlung. (13 x 100 mm Borosilikatglas - Cat# TB013)
- Plattenphotometer mit Inkubatorfunktion (37°C), das bei zwei Wellenlängen bei 405 nm und 490 nm messen kann und über einen dynamischen Bereich bis mindestens 2,0 Absorptionseinheiten verfügt, gekoppelt mit einer geeigneten computerbasierten Software für Kinetiktests.
- Sterile, glukanfreie Aufbewahrungsröhrchen mit Schraubdeckel zur Aliquotierung der Proben (die meisten Röhrchen, die als RNase- DNase- und pyrogenfrei geprüft sind, weisen keine interferierenden Mengen an (1→3)-β-D-Glukan auf).
- Parafilm®

* Diese von Associates of Cape Cod, Inc. (ACC) stammenden Produkte sind frei von interferierenden Glukanen.

Vorsicht-Glaspipetten mit Baumwollstopfen sind eine potenzielle Quelle einer Kontaminierung mit Glukan.

WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE

Dieses Produkt ist ein IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM.

<p>Der Fungitell-Test verlangt strengste Beachtung der Technik und der Testumgebung. Eine gründliche Schulung des Laboranten in Bezug auf das Testverfahren und die Vermeidung einer Kontaminierung ist für die Effektivität des Tests ausschlaggebend.</p>

- Von dem Fungitell-Test nicht erkannte Arten. Bestimmte Pilzarten produzieren sehr geringe Mengen an (1→3)-β-D-Glukan und werden daher im Fungitell-Test üblicherweise nicht erkannt. Dazu gehören die Gattung *Cryptococcus* (14,16) sowie die Zygomyceten wie *Absidia*, *Mucor* und *Rhizopus* (16,17). Darüber hinaus produziert *Blastomyces dermatitidis* in der Hefephase wenig (1→3)-β-D-Glukan und wird daher im Fungitell-Test üblicherweise nicht erkannt (18).
- Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen mit Proben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht Rauchen, Essen oder Trinken.
- Zur Durchführung des Tests muss eine saubere Umgebung geschaffen werden. Materialien und Reagenzien verwenden, die geprüft und frei von interferierenden Mengen an (1→3)-β-D-Glukan sind. Es ist zu beachten, dass Glukan und Kontaminierung mit Pilzpartikeln aus dem menschlichen Körper, aus Kleidung, Behältern, Wasser und Staubpartikeln in der Luft eine Interferenz mit dem Fungitell-Test verursachen können.

- Reagenzien nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.
- Verfärbte oder trübe Proben, beispielsweise solche, die stark hämolyisiert, lipämisch oder stark bilirubinhalting sind, können Interferenz verursachen. Werden solche Proben getestet, sind die Testergebnisse auf Hinweise einer optischen Interferenz und/oder einen ungewöhnlichen kinetischen Verlauf untersucht werden.
- Beim Umgang mit Patientenproben geeignete Schutzkleidung und ungepuderte Handschuhe tragen.
- Das Serum von Hämodialysepatienten kann hohe Mengen an (1→3)-β-D-Glukan enthalten, wenn bestimmte Celluloseodialysemembranen verwendet werden (13). Eine Hämodialyse mit Celluloseetriacetatmembranen oder Polymethylmethacrylatmembranen scheint den Test nicht zu beeinflussen.
- Chirurgische Gaze und Schwämme können hohe Mengen an (1→3)-β-D-Glukan absondern, die zu einem kontaminationsbedingten, vorübergehend positiven Ergebnis im Fungitell-Test führen können, wie bei Patienten nach einer Operation beobachtet wurde (6).
- Kits mit beschädigten Bestandteilen dürfen nicht verwendet werden.
- Materialien, die potenziell verunreinigt (pathogenhaltigen) Flüssigkeiten ausgesetzt wurden, sind nach den örtlichen Vorschriften zu entsorgen.

Lagerung der Reagenzien

Alle gelieferten Reagenzien bei 2-8°C dunkel aufbewahren. Rekonstituiertes Fungitell-Reagenz ist bei 2-8°C zu lagern und innerhalb von 2 Stunden zu verwenden. Alternativ kann rekonstituiertes Fungitell-Reagenz bis zu 20 Tage lang bei -20°C eingefroren und nach einmaligem Auftauen verwendet werden.

Handhabung der Proben

- Probennahme: Serumproben in sterile Vakuumröhrchen (roter Deckel) oder Serumtrennröhrchen entnehmen und koagulieren lassen. Anschließend das Serum vom Blutkuchen trennen und in einen geeigneten Behälter dekantieren, der frei von interferierenden Mengen an (1→3)-β-D-Glukan ist.
- Probenlagerung: Serumproben können vor dem Test bei 2-8°C aufbewahrt oder bei mindestens -20°C eingefroren werden.
- Probenkennzeichnung: Proben sind nach den anerkannten Vorgehensweisen der Einrichtung deutlich zu kennzeichnen.

VERFAHREN

Hinweis: Die Einstellungen können je nach Gerät und Software variieren. Generell folgenderweise vorgehen: Die Software des Plattenphotometers zur Erfassung von Daten im Modus Vmean einstellen. Korrekte Einstellungen sind dem Softwarehandbuch zu entnehmen, um sicherzustellen, dass der errechnete Wert der durchschnittlichen Rate der Änderung der optischen Dichte aller erfassten Datenpunkte entspricht. Das Intervall zwischen den Messungen der optischen Dichte sollte im Bereich von 15-30 Sekunden liegen. Die Softwareeinstellungen der Wellenlänge sollten 405 nm abzüglich des Hintergrunds bei 490 nm betragen. Ist keine Messung bei zwei Wellenlängen möglich, die Messung bei 405 nm durchführen. Die Inkubationstemperatur auf 37°C einstellen. Die Platte sollte vor Beginn der Messung 5-10 Sekunden geschüttelt werden. Die Kurvenanpassung auf „linear/linear“ oder eine äquivalente Methode einstellen. Die Messung ohne Verzögerungszeit beginnen.

- Zubereitung des im Kit gelieferten Glukanstandards.
 - Ein Fläschchen mit Glukanstandard in dem auf dem Fläschchen angegebenen Volumen an RGW auflösen, um eine Lösung mit 100 pg/mL herzustellen. Mindestens 30 Sekunden auf dem Vortex mischen, um die Lösung zu resuspendieren (Lösung 1). Die Glukanlösung ist bei 2-8°C zu lagern und innerhalb von drei Tagen zu verwenden. Schritt b-e unten beschreiben ein Beispiel der Vorgehensweise zum Erhalt einer Standardkurve.
 - Durch Mischen von 500 µL RGW und 500 µL Lösung 1 in einem glukanfreien Röhrchen einen Standard mit 50 pg/mL herstellen (Lösung 2). Mindestens 10 Sekunden lang auf dem Vortex mischen.
 - Durch Mischen von 500 µL RGW und 500 µL Lösung 2 in einem glukanfreien Röhrchen einen Standard mit 25 pg/mL herstellen (Lösung 3). Mindestens 10 Sekunden lang auf dem Vortex mischen.
 - Durch Mischen von 500 µL RGW und 500 µL Lösung 3 in einem glukanfreien Röhrchen einen Standard mit 12,5 pg/mL herstellen (Lösung 4). Mindestens 10 Sekunden lang auf dem Vortex mischen.
 - Durch Mischen von 500 µL RGW und 500 µL Lösung 4 in einem glukanfreien Röhrchen einen Standard mit 6,25 pg/mL herstellen (Lösung 5). Mindestens 10 Sekunden lang auf dem Vortex mischen.
- Zubereitung des Reagenz zur Vorbehandlung des Serums. Das alkalische Reagenz zur Vorbehandlung des Serums wandelt Glukane mit Dreifachhelix zu einzelsträngigen Glukanen um (10,11), die im Test reaktiver sind. Der hohe pH-Wert inaktiviert außerdem die Serinproteasen und Serinproteaseinhibitoren im Serum, die ein falsch positives bzw. ein falsch negatives Ergebnis verursachen könnten (20).
 - Das Reagenz zur Vorbehandlung des Serums herstellen, indem gleiche Volumen an 0,25 M KOH und 1,2 M KCl kombiniert und auf dem Vortex gut gemischt werden. Die Reagenz werden bis zu 900 µL empfohlen, was für zwei Zubereitungen ausreicht. Die Röhrchen zur Verwendung für die zweite Platte mit Parafilm abdecken. Zur Abdeckung der Röhrchen die dem Schutzpapier zugewandte Seite des Parafilms verwenden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		St1	St1		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
C		St2	St2		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
D		St3	St3		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
E		St4	St4		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
F		St5	St5		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
G		Blk	Blk		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
H												

- Hinweis: Bei der graphischen Darstellung der Standardkurve die Konzentration der Standards mit dem Faktor 5 multiplizieren, so dass der Bereich zwischen 500 und 31 pg/mL liegt. Die Standards als 500, 250, 125, 62,5 und 31 pg/mL in die Software eingeben.

Das Volumen des Standards im Test beträgt 25 µL je Kavität bzw. das Fünffache des Volumens der Serumprobe. Die Mikrotiterplatte mit den Standards (st), dem Leerwert (blk) und 21 unbekanntn Proben (Uk), jeweils in Zweifachbestimmungen, wird folgenderweise vorbereitet:

Hinweis 1: Die äußeren Kavitäten können verwendet werden, sofern erwiesen ist, dass die Reaktion der außenliegend Kavitäten mit der der innenliegend Kavitäten vergleichbar ist.
Hinweis 2: Zur Vorbeugung vor versehentlicher Kontaminierung den Deckel nach Zugabe von Proben und Reagenzien in die Kavitäten wieder aufsetzen. Den Deckel abnehmen, bevor die Platte in das Photometer gestellt wird, um eine optische Interferenz aufgrund von Kondensation zu vermeiden.

- Zugabe von Serum und Vorbehandlungsreagenz.
 - Gefrorene Serumproben bei Raumtemperatur auftauen lassen. Alle Proben auf dem Vortex gut mischen.
 - In jede dafür bestimmte Kavität (Uk) 5 µL der Serumprobe mindestens in zweifacher Ausführung übertragen. Für jede Serumprobe wiederholen.
 - In jede Kavität, in der sich Serum befindet, 20 µL des Serumvorbehandlungsreagenz geben. *Hinweis:* Schritt b und c können je nach Präferenz des Anwenders in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden.
 - Die Platte 5 – 10 Sekunden lang schütteln, um den Inhalt der Kavitäten zu mischen (dazu kann die Plattenschüttelfunktion des Photometers verwendet werden), und anschließend für 10 Minuten bei 37°C im Photometer mit Inkubator inkubieren.
- Rekonstitution des Fungitell-Reagenz. *Hinweis:* Dieser Schritt kann bereits während der Vorbehandlungsinkubation durchgeführt werden.
 - Ein Fläschchen Fungitell-Reagenz durch die Zugabe von 2,8 mL RGW und die anschließende Zugabe von 2,8 mL Pyrosol-Rekonstitutionspuffer mit Hilfe des 1000-µL-Pipettors rekonstituieren. Das Röhrchen mit Parafilm abdecken, wobei die dem Schutzpapier zugewandte Seite des Parafilms verwendet wird. Das Röhrchen vorsichtig schwenken, um das Reagenz vollständig zu lösen – nicht vortexen.
 - Zugabe von Negativkontrollen und Glukanstandards. Nach Beendigung der Serumvorbehandlungsinkubation (Schritt 3) die Platte aus dem Photometer/Inkubator nehmen und die Standards und Negativkontrollen in die Platte geben.
 - In die Kavitäten G2 und G3 25 µL RGW geben.
 - In die Kavitäten F2 und F3 25 µL der Standardlösung 5 (6,25 pg/mL) geben.
 - In die Kavitäten E2 und E3 25 µL der Standardlösung 4 (12,5 pg/mL) geben.
 - In die Kavitäten D2 und D3 25 µL der Standardlösung 3 (25 pg/mL) geben.
 - In die Kavitäten C2 und C3 25 µL der Standardlösung 2 (50 pg/mL) geben.
 - In die Kavitäten B2 und B3 25 µL der Standardlösung 1 (100 pg/mL) geben.
- Zugabe des Fungitell-Reagenz und Platteninkubation.
 - In jede Kavität (mit Negativkontrollen, Standards oder Proben) mit Hilfe der Stepper-Pipette 100 µL Fungitell-Reagenz geben.
 - Die Platte mit aufgesetztem Deckel in das (auf 37°C äquilibrierte) Mikroplattenphotometer stellen und 5-10 Sekunden schütteln. Deckel abnehmen und die Platte bei 405 nm minus 490 nm für 40 Minuten bei 37°C messen. Ist die Subtraktion des Hintergrunds (bei 490 nm) nicht möglich, kann die Messung bei 405 nm durchgeführt werden. Wenn das Photometer nicht über eine Schüttelfunktion für Mikrotiterplatten verfügt, kann ein externer Mikrotiterplattenschüttler verwendet werden.
 - Die erfassten Daten wie folgt analysieren: Die mittlere Rate der Veränderung der optischen Dichte (Milliabsorptionseinheiten je Minute) für alle Punkte zwischen 0 und 40 Minuten berechnen.

AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse des Fungitell-Tests können als Hilfsmittel bei der Diagnose einer invasiven Pilzinfektion herangezogen werden. Die Ergebnisse sind ausgedrückt in pg/mL Serum und liegen im Bereich zwischen nicht nachweisbar (< 31 pg/mL) und > 500 pg/mL und werden von der Software ausgedrückt oder von der Standardkurve abgelesen. Genaue Werte über 500 pg/mL erfordern eine Verdünnung der Probe in RGW und eine Wiederholung des Tests.

Das den Test durchführende Labor sollte den anfordernden Arzt darüber in Kenntnis setzen, dass der Fungitiell-Test bestimmte Pilzarten wie beispielsweise die Gattung *Cryptococcus* (16,17), die sehr wenig (1→3)-β-D-Glucan produziert, nicht nachweisen kann. Nicht erkannt von dem Test werden ferner Zygomyzeten wie beispielsweise *Absidia*, *Mucor* und *Rhizopus* (16,17), die kein (1→3)-β-D-Glucan produzieren. Auch *Blastomyces dermatitidis* produziert in der Hefephase wenig (1→3)-β-D-Glucan und wird von dem Test üblicherweise nicht erfasst (18).

NEGATIVES ERGEBNIS

(1→3)-β-D-Glucan-Werte < 60 pg/mL gelten als negatives Ergebnis.

POSITIVES ERGEBNIS

Werte >80 pg/mL gelten als positiv. Ein positives Ergebnis bedeutet, dass (1→3)-β-D-Glucan festgestellt wurde. Ein positives Ergebnis definiert nicht das Vorhandensein einer Krankheit und ist zur Diagnosestellung nur in Verbindung mit anderen klinischen Befunden zu verwenden.

AMBIVALENTES ERGEBNIS

Werte im Bereich zwischen 60 und 79 pg/mL legen eine mögliche Pilzinfektion nahe.

Es empfiehlt sich die Entnahme weiterer Proben und die Testung der Seren. Häufige Probennahme und Testung verbessern den Nutzen für die Diagnosestellung.

QUALITÄTSKONTROLLE

- Der Korrelationskoeffizient (r) der Standardkurve (linear vs. linear) sollte > 0,980 betragen.
- Die Leerwerte (25 µL RGW) sind die Negativkontrollen. Negativkontrollen sollten eine gemessene optische Dichterate (Vmean) von weniger als 50% des niedrigsten Standards aufweisen. Ist dies nicht der Fall, muss der Test unter Verwendung gänzlich neuer Reagenzien wiederholt werden.
- Handhabung problematischer Proben. Werden wolkige, verfärbte oder trübe Proben beobachtet, wie beispielsweise solche, die stark hämolysiert, lipimäßig oder bilirubinhaltig sind, ist die Probe in RGW zu verdünnen und der Test zu wiederholen. Der Verdünnung ist in der Angabe der Ergebnisse durch Multiplizieren des Ergebnisses mit dem Verdünnungsfaktor Rechnung zu tragen. Typischerweise wird der Verdünnungsfaktor in die Softwaredaten der Probe eingegeben und die Korrektur erfolgt automatisch.
- Es können Kontrollproben mit Grenzwertkonzentrationen und hoch positiven Konzentrationen gemessen werden, um zu überprüfen, dass Reagenzien und Test ordnungs-gemäß arbeiten. Jeder Anwender des Tests sollte ein Qualitätskontrollprogramm einrichten, um das Leistungsniveau des Tests sicherzustellen.

GRENZEN DES TESTS

- Die Serumkonzentrationen des Analyten können vom Gewebeort der Pilzinfektion, der Verkapselung und der Menge an produziertem (1→3)-β-D-Glucan beeinflusst werden. Eine verminderte Fähigkeit, (1→3)-β-D-Glucan in den Blutkreislauf abzugeben, kann die Fähigkeit zum Nachweis bestimmter Pilzinfektionen verringern. *Cryptococcus* spp. produzieren aufgrund der Verkapselung der Zelle wenig (1→3)-β-D-Glucan (11). Zygomyzeten, einschließlich *Absidia*, *Mucor* spp. und *Rhizopus* spp. (16,17), sind nicht bekannt dafür, (1→3)-β-D-Glucan herzustellen (16,17). *Blastomyces dermatitidis* produziert in seiner Hefephase wenig (1→3)-β-D-Glucan, und Testergebnisse sind in der Regel negativ (18).
- Manche Personen weisen einen erhöhten Spiegel an (1→3)-β-D-Glucan auf, der in den ambivalenten Bereich fällt. In solchen Fällen werden zusätzliche Tests angeraten.
- Die Häufigkeit der Testung eines Patienten richtet sich nach dem relativen Risiko einer Pilzinfektion. Bei Risikopatienten empfiehlt sich eine Probennahme mit einer Häufigkeit von mindestens zwei bis drei Mal pro Woche.
- Bei Hämodialysepatienten (12,13), Personen, die mit bestimmten fraktionierten Blutprodukten wie beispielsweise Serumalbumin und Immunglobulinen behandelt worden sind (19), und bei Proben bzw. Personen, die glukanhaltiger Gaze ausgesetzt waren, sind positive Ergebnisse erhalten worden. Es dauert 3–4 Tage, bis die Patienten wieder auf ihren Basisspiegel an (1→3)-β-D-Glucan im Serum zurückfallen, nachdem sie während einer Operation mit Schwämmen und Gaze in Kontakt waren, die (1→3)-β-D-Glucan enthalten. Der Zeitpunkt der Probennahme bei Operationspatienten ist entsprechend darauf abzustimmen.
- Proben, die mit der Fersen- oder Fingerpunktmethode erhalten werden, sind ungeeignet, da die zur Vorbereitung der Entnahmestelle verwendete alkoholgetränkte Gaze (und möglicherweise auch die Blutansammlung auf der Haut) die Proben nachweislich kontaminiert.
- Die Testkonzentrationen wurden bei erwachsenen Testpersonen bestimmt. Der Normalspiegel bei Säuglingen und pädiatrischen Patienten ist ählich wie bei Erwachsenen (21). Es liegen keine Daten zu Neugeborenen und Säuglingen unter sechs Monaten vor.
- Der Messbereich des Tests beträgt 31 pg/mL bis 500 pg/mL. Werte unter 31 pg/mL sind als < 31 pg/mL, Werte über 500 pg/mL als > 500 pg/mL anzugeben.

INTERFERIERENDE SUBSTANZEN

Folgende Probenzustände können mit einem akkuraten Fungitiell-Testergebnis interferieren:

- Hämolyse
- Probeneintrübung aufgrund einer Lipämie
- Das Vorhandensein von makroskopisch sichtbarem Bilirubin
- Trübheit des Serums

ERWARTETE WERTE

Die Betaglukanwerte sind bei verschiedenen Pilzinfektionen erhöht. Wenn bei einer Konzentration von 80 pg/mL oder darüber Anzeichen und Symptome vorhanden sind, liegt der prädiktive Wert der Wahrscheinlichkeit, dass die Testperson positiv auf eine Pilzinfektion ist, bei 74,4 bis 91,7% (Tabelle 2). Bei Nichtvorhandensein von Anzeichen und Symptomen bei unter 60 pg/mL liegt der negative prädiktive Wert bei 65,1% bis 85,1%.

LEISTUNGSMERKMALE

Vergleichstest

Es wurde eine prospektive multizentrische Studie durchgeführt, um die Leistungsmerkmale des Fungitiell-Tests zu prüfen. Der Test wurde mit anderen Standardnachweisverfahren für Mykosen und Fungämien verglichen (d. h. Blutkultur, histopathologische Untersuchung von Biopsieproben und radiologische Anzeichen).

Es wurden 359 Testpersonen getestet. Von jeder Testperson wurde eine Probe erhalten. Die Testpersonen mit geringem Risiko bestanden aus augenscheinlich gesunden Personen und solchen, die nicht wegen Pilzinfektionen ins Krankenhaus eingeliefert worden waren. Die Einschreibung der Testpersonen fand in sechs klinischen Prüfzentren in den USA statt. Der Test wurde von vier der klinischen Prüfstellen mit insgesamt 285 Proben durchgeführt. ACC testete alle 359 Proben zweimal, verwendete aber nur die zweite Ergebnisreihe, um die Testleistung zu bestimmen. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen der ersten und der zweiten Analysedatenreihe.

Die Empfindlichkeit in der gesamten Population an Testpersonen (359) einschließlich *Cryptococcus*, war 65,0% (60,1 – 70,0% Konfidenzintervall (KI)). Die Spezifität betrug 81,1% (77,1 – 85,2% KI) (Tabelle 1). Die Ergebnisse der vier Prüfstellen ergaben eine Empfindlichkeit im Bereich von 50,0% bis 66,7%. Die Spezifität in Bezug auf die 285 getesteten Proben lag bei 70,0% bis 93,0% (Tabelle 2).

Tabelle 1	Testergebnisse von ACC bei Verwendung der Cutoffkonzentration von 60-80 pg/mL nach Prüfstelle								
Prüfstelle	Bestätigt/wahrscheinlich Empfindlichkeit ≥80 pg/mL			Spezifität <60 pg/mL			Ambivalent 60<=<X<80	Gesamt	
	Pos/Klin. pos	Empfindlichkeit	Positiver prädiaktiver Wert	Neg/Klin. neg	Spezifität	Negativer prädiaktiver Wert			
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	k. A.	0/0	k. A.	0.0	0	1	
Gesamt*	106/163	65.0	80.9	159/196	81.1	76.8	21	359	

*Einschließlich einer Probe von Prüfstelle 6.

Bei Vergleich der von ACC erhaltenen Ergebnisse (359 Proben) und der von den klinischen Prüfstellen erhaltenen Ergebnisse (285 Proben) mit der klinischen Diagnose beträgt die Empfindlichkeit bei ACC 64,3% (58,8% - 69,9% KI) und bei den Prüfstellen 61,5% (55,9% - 67,2% KI). Die Spezifität bei ACC beträgt 86,6% (82,7% - 90,6% KI) gegenüber 79,6% (74,9% - 84,3% KI) bei den Prüfstellen (Tabelle 2).

Tabelle 2	Prüfstellenergebnisse bei Verwendung der Cutoffkonzentration von 60-80 pg/mL nach Prüfstelle								
Prüfstelle	Bestätigt/wahrscheinlich Empfindlichkeit ≥80 pg/mL			Spezifität <60 pg/mL			Ambivalent 60<=<X<80	Gesamt	
	Pos/Klin. pos	Empfindlichkeit	Positiver prädiaktiver Wert	Neg/Klin. neg	Spezifität	Negativer prädiaktiver Wert			
1	32/50	64.0	74.4	28/40	70.0	65.1	4	90	
2	12/24	50.0	75.0	15/20	75.0	65.2	5	44	
3 *									
4	22/33	66.7	91.7	40/43	93.0	85.1	5	76	
5	22/36	61.1	78.6	30/39	76.9	75.0	7	75	
6 *									
Gesamt, Prüfstellen	88/143	61.5	79.3	113/142	79.6	73.9	21	285	
ACC	92/143	64.3	91.1	123/142	86.6	74.1	18	285	

*** Keine Prüfstelle**

CANDIDIASE

In der prospektiven Studie gab es 107 Testpersonen, die positiv mit einer Candidiase diagnostiziert wurden. Dreieundachtzig (83) der 107 waren im Fungitiell-Test positiv.

Es wurden 175 Proben aus einer Candidiase-Bibliothek an Associates of Cape Cod geliefert, von denen sich 145 in dem Test als positiv erwiesen.

ASPERGILLOSE

Insgesamt 10 Testpersonen waren positiv auf Aspergillose. Acht der zehn waren im Test positiv.

FUSARIOSE

Drei Testpersonen waren positiv auf Fusariose. Zwei der drei waren im Test positiv.

THERAPIE MIT ANTIMYKOTIKA

Ob eine Therapie mit Antimykotika durchgeführt bzw. nicht durchgeführt wurde, hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Sensitivität des Tests. Einhundertachtzig (118) Testpersonen hatten eine bestätigte invasive Pilzinfektion und wurden mit Antimykotika behandelt. Zweieundachtzig (82) waren in dem Test positiv (Empfindlichkeit: 69,5%; 61,2% - 77,8% KI). Darüber hinaus waren vierundzwanzig (24) Personen bestätigt positiv, wurden jedoch nicht mit Antimykotika behandelt. Achtzehn (18) waren in dem Test positiv (Empfindlichkeit: 75%; 57,7% - 92,3% KI).

SPEZIFITÄT

Insgesamt 170 Testpersonen waren negativ auf Pilzinfektionen und augenscheinlich gesund. Die Spezifität des Tests betrug 86,5% (82,8% - 90,1% KI). Bei Testung der zusätzlichen 26 Personen, die negativ auf Pilzinfektion waren, aber an anderen Krankheiten litten, wurde eine Spezifität von 81,1% erzielt (77,1 – 85,2% KI).

TESTKORRELATIONEN

Vier der klinischen Prüfstellen testeten insgesamt 285 Proben. Die Testergebnisse der Prüfstellen korrelierten quantitativ zu 96,4% mit den bei Associates of Cape Cod erzielten Ergebnissen. Die Korrelation der bei Associates of Cape Cod erzielten Ergebnisse mit den Ergebnissen anderer Prüfstellen lag im Bereich von 90,6% bis 99,2%.

PRÄZISION












In den Präzisionsstudien wurden zehn (10) verschiedene Proben jeweils von drei verschiedenen Prüfstellen an drei verschiedenen Tagen getestet. Die Intra-Assay-Variabilität lag im Bereich von 0,9 bis 28,9%. Die Inter-Assay-Werte lagen im Bereich von 3,9% bis 23,8%. Die vier (4) negativen Proben wurden aus beiden Analysen ausgeschlossen.

- Alexander, B., Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. Transpl. Infectious Dis. 2002; 4 (Suppl. 3):32-37.
- 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 (24):1741-1751.
- Obayashi, et.al. Plasma (1,3)-beta-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet. 1995; 345:17-20.
- Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2004) -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.
- Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. (2005) A prospective pilot survey of B-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.
- Ascioglu, et.al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. Clinical Infectious Diseases. 2002; 34:7-14.
- Iwanaga, S., Morita, T., Nakamura, T., and Aketagawa, J. (1986) The hemolymph coagulation system in invertebrate animals. J. Protein Chem 5: 255-268.
- 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* ameobocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. Carbohydrate Res. 217:181-190.
- Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and Saito, H. (1993) Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-β-D-glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. J. Biochem 113:683-686.
- Kato, A. Takita, T, Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. (2001) Elevation of blood (1→3)-Beta-D-glucan concentrations in hemodialysis patients. Nephron 89:15-19.
- 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.
- 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.
- 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 measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. Lancet 345: 17-20.
- Odabasi, Z., Paetznick, 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.
- Mitsuya, M., Wada, K. and Yamaguchi, H. (1994) In vitro studies on the release of G Test-positive (1→3)-β-D-glucans from various fungal pathogens. In Committee on Organic Dusts, ICOH, Report 1/94, Rylander, R. and Goto, H. editors. pp 29-37.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

WEITERE, NICHT ZITIERTE LITERATUR

- Obayashi, T., Yoshida, M., Tamura, H., (1→3)-β-D-glucans Aketagawa, J., Tanaka, S., and Kawai, T. (1992) Determination of plasma (1→3)-β-D-glucan: A new diagnostic aid to deep mycosis. J. Medical and Vet. Mycol. 30: 275-280.
- 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. Clinica Chimica Acta 226: 109-112.
- Yasuoka, A., Tachikawa, N., Shimada, K., Kimura, S., and Oka, S. (1996) (1→3)-β-D-glucan as a quantitative serological marker for Pneumocystis carinii pneumonia. Clinical and Diagnostic. Lab. Immuno. 3: 197-199.
- Yoshida, M., Obayashi, T., Iwama, A., Ito, M., Tsunoda, S., Suzuki, T., Muroi, K. Ohta, M., Sakamoto, S., and Miura, Y. (1997) Detection of plasma (1→3)-β-D-glucan in patients with *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* and *Acremonium* Fungaemias. J. Med. Vet. Mycology 35:371-374.
- Yuasa, K., Goto, H., Iguchi, M., Okamura, T., and Ieki, R. (1996) Evaluation of the diagnostic value of the measurement of (1→3)-β-D-glucan in patients with pulmonary aspergillosis. Respiration 63: 78-83.

SYMBOLE	
	“Verwendbar bis”
	“Inhalt ausreichend für ‘N’ Tests”
	“Chargen-Bezeichnung”
	“Medizinprodukt für die In Vitro-Diagnostik”
	“Katalog-Nr.”
	“Temperaturbegrenzung”
	“Hersteller”
	“Gebrauchsanleitung beachten”
	“Autorisierte Vertretung”
	“CE-Zeichen”
	Associates of Cape Cod® International, Inc. Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, GB