

## Test auf (1→3)-β-D-Glukan in Serum

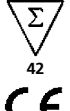
**FUNGITELL®**

### Gebrauchsanleitung



ASSOCIATES OF  
**CAPE COD**  
INCORPORATED

Telefon: +1 508 540-3444  
Gebührenfrei: +1 888 395-2221  
Fax: +1 508 540-8680  
Technischer Kundendienst: +1 800 848-3248  
Kundendienst: +1 800 525-8378



PN001268-de Rev 1

Überarbeitet Februar 2011

#### 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 (1), kann als Hilfsmittel bei der Diagnose tiefsitzender Mykosen und Fungämien (2) herangezogen werden. Ein positives Ergebnis zeigt nicht an, welche Klasse von Pilzen die Infektion verursachen könnte.

Fungitell sollte in Verbindung mit anderen diagnostischen Verfahren, wie beispielsweise mikrobiologischen Kulturen, der histologischen Untersuchung von Biopsieproben und radiologischen Untersuchungen, angewandt werden.

#### Wichtig – Es wird empfohlen, folgende Informationen an den anfordernden Arzt weiterzugeben:

Der Fungitell-Test kann bestimmte Pilzarten wie beispielsweise die Gattung *Cryptococcus*, die sehr wenig (1→3)-β-D-Glukan (3,4) produziert, nicht erkennen. Nicht erkannt werden ferner Zygomyceten wie beispielsweise *Absidia*, *Mucor* und *Rhizopus* (1,4), die bekanntlich kein (1→3)-β-D-Glukan produzieren. Darüber hinaus produziert auch die Hefephase von *Blastomyces dermatitidis* wenig (1→3)-β-D-Glukan und wird von dem Test gegebenenfalls nicht erkannt (5).

#### Diese Angaben sind den Testergebnissen des Glukantests beizulegen.

#### ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Es ist eine Zunahme der Inzidenz von Pilzinfektionen durch opportunistische Pathogene festzustellen, vor allem bei immunkompromitierten Patienten (6,7,8). 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 (9,10). 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 (11,12). Die Diagnose invasiver Mykosen und Fungämien beruht üblicherweise auf unspezifischen diagnostischen oder radiologischen Techniken. Vor kurzem wurden biologische Marker für Pilzinfektionen den verfügbaren Diagnosemethoden hinzugefügt (2).

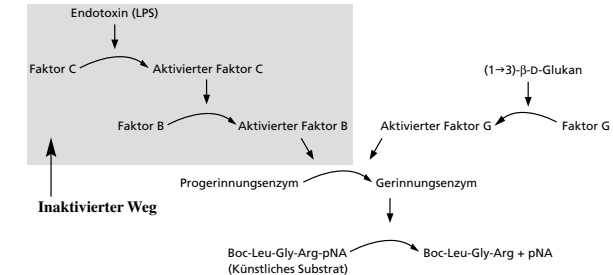
Opportunistische Pilzpathogene sind unter anderem *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* und *Pneumocystis jirovecii*. Der Fungitell-Test dient dem Nachweis des von diesen und anderen Organismen produzierten (1→3)-β-D-Glukans (1,8,13).

#### 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 (14,15,16,17), 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.

**ABBILDUNG 1**  
*Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Weg



#### 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:

1. Fungitell® Reagenz, ein lyophilisiertes LAL, das für (1→3)-β-D-Glukan spezifisch ist (zwei Fläschchen)
2. Pyrosol®-Rekonstitutionspuffer, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (zwei Fläschchen). Zusätzliche Fläschchen Pyrosol-Rekonstitutionspuffer (Katalognummer BC051) können separat gekauft werden.
3. Glukanstandard, lyophilisiertes Pachyman und inerte Füllsubstanz mit auf dem Etikett angegebener Konzentration von (1→3)-β-D-Glukan (zwei Fläschchen)
4. Reinstgüte Wasser (RGW); (zwei Fläschchen)
5. Pyroplates: Unbeschichtete Flachbodenplatten mit 96 Kavitäten mit Deckel, frei von interferierenden Glukanen (zwei)
6. KCl 1,2 M (ein Fläschchen)
7. KOH 0,25 M (ein Fläschchen)

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.

1. Pipettenspitzen\* (250 µL - Cat# PPT25, 1000 µL - Cat# PPT10)
2. Pipetten zur Abgabe von Volumina von 5-25 µL und 100-1000 µL
3. Stepper-Pipette mit Spritzen spitzen zur Abgabe von 100 µL
4. Teströhrchen\* zur Herstellung der Standardreihe und zur Kombination der Reagenzien zur Serumbehandlung. (13 x 100 mm Borosilikatglas - Cat# TB013)
5. 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.
6. 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).
7. 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 Kontamination mit Glukan.

#### WARNUNGEN UND VORSICHTSHINWEISE

**Dieses Produkt ist ein IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM.**

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 Kontamination ist für die Effektivität des Tests ausschlaggebend.

1. 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* (3,4) sowie die Zygomyceten wie *Absidia*, *Mucor* und *Rhizopus* (1,4). Darüber hinaus produziert *Blastomyces dermatitidis* in der Hefephase wenig (1→3)-β-D-Glukan und wird daher im Fungitell-Test üblicherweise nicht erkannt (5).
2. Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen mit Proben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht Rauchen, Essen oder Trinken.
3. 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 Kontamination mit Pilzpartikeln aus dem menschlichen Körper, aus Kleidung, Behältern, Wasser und Staubpartikeln in der Luft eine Interferenz mit dem Fungitell-Test verursachen können.
4. Reagenzien nach Ablauf ihres Verfalldatums nicht mehr verwenden.

5. Verfärbte oder trübe Proben, beispielsweise solche, die stark hämolytisch, lipämisch oder stark bilirubinhalzig sind, können Interferenz verursachen. Werden solche Proben getestet, sind die Testergebnisse auf Hinweise einer optischen Interferenz und/oder einen ungewöhnlichen kinetischen Verlauf untersucht werden.
6. Beim Umgang mit Patientenproben geeignete Schutzkleidung und ungepuderte Handschuhe tragen.
7. Das Serum von Hämodialysepatienten kann hohe Mengen an (1→3)-β-D-Glukan enthalten, wenn bestimmte Cellulosedialysemembranen verwendet werden (18,19). Eine Hämodialyse mit Cellulosetriacetatmembranen oder Polymethylmethacrylatmembranen scheint den Test nicht zu beeinflussen.
8. Chirurgische Gaze und Schwämme können hohe Mengen an (1→3)-β-D-Glukan absondern, die zu einem kontaminationsbedingtem, vorübergehend positiven Ergebnis im Fungitell-Test führen können, wie bei Patienten nach einer Operation beobachtet wurde (20,21).
9. Kits mit beschädigten Bestandteilen dürfen nicht verwendet werden.
10. 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

1. Probenahme: 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.
2. Probenlagerung: Serumproben können vor dem Test bei 2-8°C aufbewahrt oder bei mindestens -20°C eingefroren werden. Die Tests sollten sofort durchgeführt werden, um die Möglichkeit einer Proben Degradierung zu vermeiden.
3. Probenkennzeichnung: Proben sind nach den anerkannten Vorgehensweisen der Einrichtung deutlich zu kennzeichnen.

#### VERFAHREN

Hinweis: Die Einstellungen können je nach Gerät und Software variieren. Generell folgen-deres 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 auf das von Gerät und Software erlaubte Minimum über die 40-Minuten-Periode des Tests eingestellt werden. 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.

1. Zubereitung des im Kit gelieferten Glukanstandards.
  - a. 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.
  - b. 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.
  - c. 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.
  - d. 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.
  - e. 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.
2. Zubereitung des Reagenz zur Vorbehandlung des Serums. Das alkalische Reagenz zur Vorbehandlung des Serums wandelt Glukane mit Dreifachhelix zu einzelsträngigen Glukanen um (16,17), die im Test reagieren sind. Der hohe pH-Wert inaktiviert außerdem die Serinproteasen und Serinproteaseinhibitoren im Serum, die ein falsch positives bzw. ein falsch negatives Ergebnis verursachen könnten (22).
  - a. 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. Je 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.

- i. 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), den Negativkontrollen (Neg) und 21 unbenutzten Proben (Uk), jeweils in Zweifachbestimmungen, wird folgenderweise vorbereitet:*

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

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.

3. Zugabe von Serum und Vorbehandlungreagenz.
  - a. Gefrorene Serumproben bei Raumtemperatur auftauen lassen. Alle Proben auf dem Vortex gut mischen.
  - b. In jede dafür bestimmte Kavität (Uk) 5 µL der Serumprobe mindestens in zweifacher Ausführung übertragen. Für jede Serumprobe wiederholen.
  - c. In jede Kavität, in der sich Serum befindet, 20 µL des Serumvorbehandlungreagenz geben. *Hinweis:* Schritt b und c können je nach Präferenz des Anwenders in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden.
  - d. 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.
4. Rekonstitution des Fungitell-Reagenz. Hinweis: Dieser Schritt kann bereits während der Vorbehandlungsinkubation durchgeführt werden.
  - a. 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.
5. 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.
  - a. In die Kavitäten G2 und G3 25 µL RGW geben.
  - b. In die Kavitäten F2 und F3 25 µL der Standardlösung 5 (6,25 pg/mL) geben.
  - c. In die Kavitäten E2 und E3 25 µL der Standardlösung 4 (12,5 pg/mL) geben.
  - d. In die Kavitäten D2 und D3 25 µL der Standardlösung 3 (25 pg/mL) geben.
  - e. In die Kavitäten C2 und C3 25 µL der Standardlösung 2 (50 pg/mL) geben.
  - f. In die Kavitäten B2 und B3 25 µL der Standardlösung 1 (100 pg/mL) geben.
6. Zugabe des Fungitell-Reagenz und Platteninkubation.
  - a. In jede Kavität (mit Negativkontrollen, Standards oder Proben) mit Hilfe der Stepper-Pipette 100 µL Fungitell-Reagenz geben.
  - b. 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.
  - c. Die erfassten Daten wie folgt analysieren: Die Testplots für die optische Dichte untersuchen und auf andere kinetische Muster als einen glatten Anstieg im Vergleich zu den Standards hin überprüfen. Plots, die eine optische Interferenz anzeigen, ungültig machen. 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 sollten 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. Genauere 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 Fungitell-Test bestimmte Pilzarten wie beispielsweise die Gattung *Cryptococcus* (3,4), die sehr wenig (1→3)-β-D-Glukan produziert, nicht nachweisen kann. Nicht erkannt von dem Test werden ferner *Zygomyceten* wie beispielsweise *Absidia*, *Mucor* und *Rhizopus* (1,4),

