

## Saggio per (1→3)-β-D-Glucano nel siero

**FUNGITELL®**

### Istruzioni per l'uso

	<p>Telefono: +1 508 540-3444</p> <p>Numero verde: +1 888 395-2221</p> <p>Fax: +1 508 540-8680</p> <p>Assistenza tecnica: +1 800 848-3248</p> <p>Servizio clienti: +1 800 525-8378</p>	<p></p> <p><b>42</b></p> <p></p>
--	---	--

PN001268-it

Rev 000 Testo rivisto nel dicembre 2007

#### DESTINAZIONE D'USO

Fungitell è un saggio colorimetrico a base di proteasi zimogeni, formulato per la determinazione qualitativa di (1→3)-β-D-Glucano nel siero di pazienti presentanti sintomi di micosi invasive o con condizioni mediche predisponenti a infezioni di tale natura. La concentrazione sierica di (1→3)-β-D-Glucano, un importante componente della parete cellulare di molteplici micosi di rilievo dal punto di vista medico, può essere utilizzata come coadiuvante nella diagnosi di micosi e fungemie radicate. Un esito positivo non indica la specifica classe micotica responsabile per l'infezione.

Il saggio è indicato per la diagnosi presuntiva delle micosi e deve essere usato congiuntamente ad altre procedure diagnostiche, come colture microbiologiche, analisi istologiche di campioni bioptici ed esami radiologici.

#### Importante – Si consiglia di fornire le presenti informazioni ai medici richiedenti:

Il saggio Fungitell non rileva la presenza di talune specie fungine, come il genere *Cryptococcus* (9) che produce livelli esigui di (1→3)-β-D-Glucano. Non è neppure in grado di rilevare la presenza di zigomiceti come *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus* (17), che non producono (1→3)-β-D-Glucano. Inoltre, la fase lievito di *Blastomyces dermatitidis* produce esigui livelli di (1→3)-β-D-Glucano e non è rilevata da questo saggio (18).

#### Includere questa dichiarazione al momento di riferire gli esiti del test con il Saggio per Glucano.

#### RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

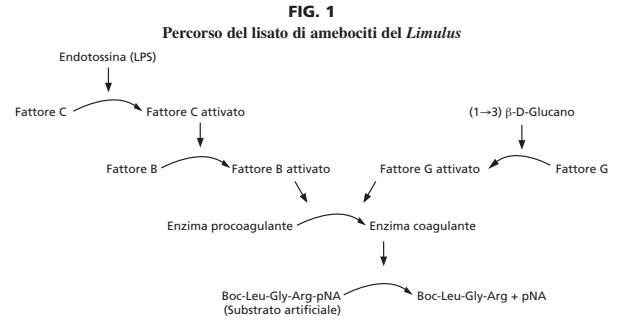
L'incidenza delle micosi è in aumento, sia su azione di patogeni primari che opportunistici, particolarmente fra i pazienti immunocompromessi (2,3,4). Micosi invasive, come infezioni di tipo opportunistico, sono comuni tra i pazienti affetti da neoplasie ematologiche maligne e da AIDS e rappresentano un numero sempre maggiore di infezioni nosocomiali, particolarmente fra soggetti reduci da impianto di organi e che ricevono terapie immunosoppressive (1,4). Molte patologie mitotiche sono acquisite con inalazione di spore fungine provenienti dal suolo, da detriti vegetali, da impianti di climatizzazione e/o da superfici esposte. Taluni funghi opportunistici sono presenti in/su cute umana, tratto intestinale e mucose (7). Di norma la diagnosi delle micosi e fungemie invasive si basa su tecniche diagnostiche o radiologiche di natura non specifica.

Tra i principali patogeni micotici umani vi sono *Candida* spp. e *Aspergillus* spp.. I patogeni micotici opportunistici includono *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Pneumocystis carinii*. Il (1→3)-β-D-Glucano prodotto da questi e da altri organismi è rilevabile mediante il saggio Fungitell (4,5, 16).

#### PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il saggio Fungitell misura i livelli di (1→3)-β-D-Glucano. Si basa su una modifica del lisato di amebociti del *Limulus* (LAL) (8-11). Fig. 1. Il reagente Fungitell è stato modificato per eliminare il Fattore C e dunque reagire esclusivamente al (1→3)-β-D-Glucano tramite la sezione del percorso mediato dal fattore G.

Il (1→3)-β-D-Glucano attiva il Fattore G, uno zimogeno di serina-proteasi. Il Fattore G trasforma l'enzima procoagulante inattivo nell'enzima coagulante attivo, che porta a sua volta alla separazione del pNA dal substrato cromogeno del peptide, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, creando un cromoforo con assorbimento a 405 nm. Il saggio cinetico Fungitell, descritto di seguito, si basa sulla determinazione del tasso di aumento di densità ottica prodotto da un campione. Questo tasso viene interpretato con riferimento a una curva standard, per portare a stime della concentrazione di (1→3)-β-D-Glucano presente nel campione.



#### MATERIALI FORNITI CON IL KIT FUNGITELL

Il kit Fungitell è formulato per l'uso diagnostico *in vitro*. I materiali seguenti, tutti forniti con ciascun kit, sono sufficienti per dosare 110 pozzetti su due piastre per microtitolazione (ciascuna contenente 55 pozzetti):

- Reagente Fungitell®, un LAL liofilizzato specifico per il (1→3)-β-D-Glucano (due fiale)
- Tampone di ricostituzione Pyrosol, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (due fiale)
- Standard di glucano, pachyman liofilizzato e carica inerte, con etichetta indicante il contenuto di (1→3)-β-D-Glucano (due fiale)
- Acqua per reagente (RGW) (due flaconi)
- Pyroplates: Micropiastre non rivestite, a fondo piatto per 96 pozzetti, provviste di coperchi ed esenti da glucani interferenti (due)
- KCl 1,2 M (una fiala)
- KOH 0,25 M (una fiala)

Nessuno dei suddetti componenti, fatta eccezione per lo standard, contiene livelli di (1→3)-β-D-Glucano in grado di causare interferenza.

#### MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Tutti i materiali usati devono essere esenti da glucano interferente. Per risultare idonei all'uso, gli articoli in vetro vanno depirogenati con calore a secco, a una temperatura minima di 235°C per 7 ore (o altro equivalente convalidato).

- Puntali\* (250 µL – Cat. n. PPT25, 1000 µL – Cat. n. PPT10)
- Pipettatori in grado di erogare 5-25 µL e volumi di 100-1000 µL
- Pipettore stepper, con punte per siringa, in grado di erogare 100 µL
- Provette per test\*, per preparazione serie standard e per la combinazione dei reagenti di trattamento. (13 x 100 mm vetro borosilicato – Cat. n. TB013)
- Lettore di micropiastre (37°C) in grado di eseguire monitoraggio a doppia lunghezza d'onda, a 405 e a 490 nm, con range dinamico fino ad almeno 2,0 unità di assorbimento, corredato di idoneo software di computer per saggi cinetici.
- Provette di conservazione con tappo a vite, sterili e senza glucano, per aliquotare i campioni (gran parte delle provvette certificate come esenti da RNase, DNase e pirogeno non presentano livelli interferenti di (1→3)-β- D-Glucano).
- Pellicola Parafilm\*

\* Questi prodotti, forniti da Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), sono certificati esenti da glucani interferenti.

**Attenzione-**le pipette in vetro con tappo in cotone sono una potenziale fonte di contaminazione da glucani.

#### AVVERTENZE E PRECAUZIONI

**Questo prodotto è per USO DIAGNOSTICO IN VITRO.**

<p>Il saggio Fungitell richiede grande attenzione nei riguardi della tecnica e dell'ambiente di analisi. A garanzia della sua efficacia, è essenziale che il tecnico riceva pieno addestramento nella metodologia di esecuzione e nella prevenzione della contaminazione.</p>
---

- Specie non rilevate dal saggio Fungitell. Alcune specie fungine producono livelli esigui di (1→3)-β-D-Glucano e non sono normalmente rilevabili con il saggio Fungitell. Tali specie includono il genere *Cryptococcus* (14,16) e i zigomiceti come *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus* (16,17). Inoltre, nella sua fase lievito *Blastomyces dermatitidis* produce bassi livelli di (1→3)-β-D-Glucano e pertanto di norma non è rilevabile utilizzando il saggio Fungitell (18).
- Non pipettare nessun materiale con la bocca. Non fumare né consumare cibi o bevande nelle aree destinate al trattamento dei campioni o dei reagenti del kit.
- Preparare un ambiente pulito in cui eseguire il saggio. Utilizzare materiali e reagenti certificati esenti da livelli interferenti di (1→3)-β-D-Glucano. Si ricorda che sia il glucano, sia la contaminazione fungina causata dal corpo umano, da indumenti, contenitori, acqua e polveri aeree, possono interferire con il saggio Fungitell.
- Non usare i reagenti oltre la data di scadenza indicata.

- Campioni scoloriti o torbidi, come quelli macroscopicamente emolizzati, lipemici o contenenti eccessiva bilirubina, possono causare interferenza. Se tali campioni sono sottoposti a test, gli esiti devono essere esaminati per escludere interferenza ottica e/o insolita distribuzione dell'andamento cinetico.
- Munirsi di idonei indumenti protettivi e guanti senza polvere al momento di maneggiare i campioni dei pazienti.
- Il siero dei pazienti emodializzati può contenere alti livelli di (1→3)-β-D-Glucano nel caso dell'impiego di talune membrane celluloseiche per dialisi (13). L'emodialisi eseguita con membrane celluloseiche di triacetato o di polimetilmetacrilato non sembrano influire su questo saggio.
- Garze e spugne chirurgiche possono presentare alti livelli di (1→3)-β-D-glucano e ciò potrebbe contribuire a risultati temporaneamente positivi, dovuti alla contaminazione del saggio Fungitell come osservati fra pazienti postoperatori (6).
- Non usare un kit se il suo contenuto presenta difetti.
- I materiali esposti a liquidi potenzialmente contaminati (contenenti patogeni) devono essere smaltiti secondo modalità consone ai regolamenti locali.

#### Conservazione dei reagenti

Conservare tutti i reagenti così come forniti, a una temperatura di 2-8°C e al riparo dalla luce. Il reagente Fungitell ricostituito va conservato a 2-8°C e utilizzato entro 2 ore. In alternativa, dopo la ricostituzione questo reagente può essere congelato a -20°C per un massimo di 20 giorni. Scongellarlo una sola volta e utilizzarlo.

#### Trattamento dei campioni

- Raccolta dei campioni: Conservare i campioni di siero all'interno di provette sterili sottovuoto (tappo rosso) o provette per separazione sierica (SST) e lasciare coagulare. In seguito, il siero viene separato dal coagulo e decantato in un recipiente idoneo e non contenente livelli di (1→3)-β-D-glucano in grado di interferire con il test.
- Conservazione dei campioni: I campioni di siero possono essere conservati a 2-8°C prima del saggio, oppure congelati a -20°C o a temperatura inferiore.
- Etichettatura dei campioni: I campioni vanno etichettati in modo chiaro, in base alle prassi approvate presso l'istituto.

#### PROCEDURA

NB: Le impostazioni possono variare a seconda della strumentazione e dei software usati. In generale valgono i seguenti principi: Configurare il software per la lettura delle piastre per la raccolta dei dati nella modalità Vmean. Consultare il manuale del software per determinare le impostazioni corrette, affinché il valore calcolato corrisponda al tasso medio di variazione nella densità ottica per tutti i datapoint raccolti. L'intervallo fra le 'letture' della densità ottica deve rientrare fra 15 e 30 secondi. Le regolazioni per la lunghezza d'onda del swofare dovrebbero essere 405 nm meno il background a 490 nm. Se non si dispone della lettura a doppia lunghezza d'onda, eseguire la lettura a 405 nm. La temperatura di incubazione deve essere impostata a 37°C. La piastra deve essere agitata per 5 – 10 secondi prima di avviare la lettura. La regolazione della curva deve essere 'lineare/lineare' o equivalente. Iniziare a leggere i risultati senza alcun tempo di latenza.

- Preparazione dello standard di glucano incluso nel kit.
  - Sciogliere il contenuto di una fiala di standard di glucano nel volume di acqua RGW indicato sulla fiala, per ottenere una soluzione di 100 pg/mL. Agitare su vortex almeno 30 secondi per la risospensione (soluzione 1). La soluzione di glucano va conservata a 2-8°C e utilizzata entro tre giorni. I punti b-e che seguono illustrano un esempio di schema per preparare una curva standard.
  - Preparare uno standard di 50 pg/mL miscelando 500 µL di RGW e 500 µL di soluzione 1 in una provetta non contenente glucano (soluzione 2). Agitare su vortex per almeno 10 secondi.
  - Preparare 25 pg/mL di standard miscelando 500 µL di RGW e 500 µL di soluzione 2 in una provetta non contenente glucano (soluzione 3). Agitare a vortice per almeno 10 secondi.
  - Preparare 12,5 pg/mL di standard miscelando 500 µl di RGW e 500 µl di soluzione 3 in una provetta non contenente glucano (soluzione 4). Agitare su vortex per almeno 10 secondi.
  - Preparare 6,25 pg/mL di standard miscelando 500 µl di RGW e 500 µL di soluzione 4 in una provetta non contenente glucano (soluzione 5). Agitare su vortex per almeno 10 secondi.
- Preparazione del reagente per il pretrattamento del siero. Il reagente alcalino per pretrattare il siero trasforma i glucani a tripla elica in glucani a singola elica (10,11) che risultano più reattivi nel saggio. Inoltre, il suo elevato pH inattiva le proteasi seriniche e i loro inibitori nel siero, che possono dare adito rispettivamente ad esiti falsi positivi e falsi negativi (20).
  - Preparare il reagente di pretrattamento per siero abbinando pari volumi di 0,25 M KOH e 1,2 M KCl e agitando bene su vortex. I volumi consigliati sono un massimo di 900 µL di ciascun reagente, per ottenere due preparazioni. Coprire le fiale con pellicola Parafilm, per utilizzarlo con la seconda piastra. Ricoprire la fiala con Parafilm utilizzando il lato della pellicola a contatto con la copertura in carta.

	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												

- NB: Al momento di eseguire la curva standard, moltiplicare per cinque la concentrazione degli standard, affinché il range sia fra 500 a 31 pg/mL. Inserire gli standard nelle impostazioni del software rispettivamente come: 500, 250, 125, 62,5 e 31 pg/mL.

*Il volume di standard nel saggio è 25 µL per ciascun pozzetto, o il quintuplo rispetto al volume del campione di siero. La piastra di microtitolazione con gli standard (st), i bianchi (blk) e 21 campioni non determinati (Uk), ciascuno dosato in duplicato, viene preparata come segue:*

Nota 1: È possibile usare i pozzetti esterni, purché il loro rendimento sia stato dimostrato come rapportabile a quello dei pozzetti interni.
Nota 2: A scanso di contaminazione accidentale, ricoprire la micropiastra dopo aver aggiunto i campioni e i reagenti nei pozzetti. Togliere il coperchio prima di inserire la piastra nel lettore, per evitare interferenza ottica a causa della condensa.

- Aggiunta del siero e del reagente di pretrattamento.
  - Scongelare a temperatura ambiente i campioni di siero congelato. Agitare bene su vortex tutti i campioni.
  - Trasferire 5 µl di campione di siero in ognuno dei pozzetti designati (Uk), almeno in duplicato. Ripetere per tutti i restanti campioni di siero.
  - Aggiungere 20 µl di reagente per pretrattamento del siero in tutti i pozzetti contenenti siero.
- NB: I punti b – c della procedura sono eseguibili in ordine inverso, in base alle preferenze del tecnico.
- Agitare la piastra per 5 – 10 secondi, per miscelare a fondo il contenuto dei pozzetti (per fare questo è possibile utilizzare la funzione di agitazione della piastra fornita dallo strumento di lettura). In seguito, incubare per 10 minuti a 37°C, all'interno del lettore delle piastre di incubazione.
- Ricostituzione del reagente Fungitell. NB: È possibile procedere comodamente alla ricostituzione durante la fase di incubazione di pretrattamento.
  - Ricostituire una singola fila di reagente Fungitell aggiungendo 2,8 mL di acqua RGW e poi altri 2,8 mL di tampone di ricostituzione Pyrosol, utilizzando il pipettatore da 1000 µL. Coprire la fiala con pellicola Parafilm, usando il lato della pellicola a contatto con la copertura in carta. Ruotare delicatamente la fiala per sciogliere completamente il contenuto (non agitare su vortex).

- Aggiunta dei controlli negativi e degli standard di glucano. Al termine dell'incubazione per pretrattare il siero (punto 3.d), estrarre la piastra in incubazione dal lettore di micropiastre e aggiungere gli standard e i controlli negativi.
  - Aggiungere 25 µL di acqua RGW ai pozzetti G2 e G3.
  - Aggiungere 25 µL della soluzione standard 5 da 6,25 pg/mL ai pozzetti F2 ed F3.
  - Aggiungere 25 µL della soluzione standard 4 da 12,5 pg/mL ai pozzetti E2 ed E3.
  - Aggiungere 25 µL della soluzione standar 3 da 25 pg/mL standard ai pozzetti D2 e D3.
  - Aggiungere 25 µL della soluzione standard 2 da 50 pg/mL ai pozzetti C2 e C3.
  - Aggiungere 25 µL della soluzione standard 1 da 100 pg/mL ai pozzetti B2 e B3.
- Aggiunta del reagente Fungitell e procedura di incubazione della piastra.
  - Aggiungere 100 µl di reagente Fungitell a ciascuno dei pozzetti (contenenti controlli negativi, standard e capioni), utilizzando il pipettatore stepper.
  - Inserire la piastra nel lettore per micropiastre (posizionato a 37°C), tenendo il coperchio chiuso, e agitare per 5-10 secondi. Leggere la piastra dopo aver tolto il coperchio, a 405 nm meno 490 nm, per 40 minuti a 37°C. Se non si dispone della sottrazione del background (a 490 nm), è accettabile eseguire la lettura a 405 nm. In assenza di funzione di agitazione sul lettore per micropiastre è possibile ricorrere a un agitatore esterno per micropiastre.
  - Raccogliere i dati e analizzarli nel modo seguente: Calcolare il tasso medio di variazione della densità ottica (unità di milliassorbanza al minuto), per tutti i punti fra 0 e 40 minuti.

#### INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Gli esiti del test Fungitell devono essere usati come coadiuvanti nella diagnosi delle micosi invasive. I risultati sono espressi in pg/mL di siero e vanno da valori non riscontrabili

(<31 pg/mL) fino a > 500 pg/mL. Sono stampati dal software oppure letti dalla curva standard. Valori accurati al di sopra di 500 pg/mL richiedono la diluizione del campione in acqua RGW e la ripetizione del test.

Il laboratorio che esegue il test deve informare il medico richiedente del fatto che il test Fungitell non rileva talune specie fungine come il genere *Cryptococcus* (16,17), che produce livelli esigui di (1→3)-β-D-Glucano, e neppure gli Zigmaticeti come *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus* (16,17), per i quali snon si prevede la produzione di (1→3)-β-D-Glucano. Analogamente, in fase di lievito *Blastomyces dermatitidis* produce livelli molto contenuti di (1→3)-β-D-Glucano e pertanto non è normalmente rilevabile (18).

## ESITO NEGATIVO

Valori di (1→3)-β-D-Glucano < 60 pg/mL sono interpretati come esiti negativi.

## ESITO POSITIVO

Valori >80 pg/mL sono interpretati come positivi. Un esito positivo significa che il saggio ha rilevato la presenza di (1→3)-β-D-Glucano. Un risultato positivo non definisce la presenza di patologia e va utilizzato unitamente ad altri esiti clinici per pervenire alla diagnosi.

## ESITO INDETERMINATO

Valori da 60 a 79 pg/mL suggeriscono una possibile micosi. In tali casi si consiglia di procedere alla raccolta e all'analisi di ulteriori campioni di siero. Campionamento e test frequenti accrescono l'utilità ai fini diagnostici.

## CONTROLLO QUALITATIVO

- Il coefficiente di correlazione (r) della curva standard (lineare versus lineare) deve essere > 0,980.
- I bianchi (25 µL di RGW) sono i controlli negativi e il loro tasso di densità ottica (Vmean) non deve superare 50% dello standard più basso. In caso contrario, ripetere il saggio usando reagenti completamente nuovi.
- Trattamento dei campioni problematici. Se dall'analisi emergono campioni opachi, scoloriti o torbidi, ad esempio microscopicamente emolizzati, lipemici o contenenti eccessiva bilirubina, diluirli in acqua RGW e ripetere il test. La diluizione deve essere considerata al momento di riferire i risultati, moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione. Di solito il fattore di diluizione per il campione viene inserito al momento di configurare il software, che procede automaticamente ad applicare la necessaria correzione.
- È possibile dosare campioni di controllo, a livelli di cut-off e altamente positivi, per verificare il corretto rendimento dei reagenti e del saggio. Ciascun utente del test deve stabilire un proprio programma di controllo qualitativo, a garanzia dell'eccellenza esecutiva del test.

## LIMITAZIONI DEL TEST

- Le sedi tissutali della micosi (10), l'incapsulazione e la quantità di (1→3)-β-D-Glucano prodotta da talune specie fungine può influire sulla concentrazione dell'analita nel siero. La ridotta capacità di apportare (1→3)-β-D-Glucano alla circolazione sanguigna può compromettere le possibilità di rilevare alcune micosi. *Cryptococcus* spp. produce bassi livelli di (1→3)-β-DGlucono (11) a causa dell'incapsulazione cellulare. Per gli zigmaticeti, compresi *Absidia*, *Mucor* spp. e *Rhizopus* spp. (16,17), non si conosce produzione di (1→3)-β-D-Glucano (16,17). *Blastomyces dermatitidis*, nella sua fase lievito, produce esigue quantità di (1→3)-β-D-Glucano e il test dà solitamente esito negativo (18).
- Alcuni soggetti presentano alti livelli di (1→3)-β-D-glucano che rientrano nella fascia indeterminata. In tali casi, si consiglia di procedere ad ulteriori analisi.
- La frequenza dell'analisi dei pazienti dipenderà dal rischio relativo di micosi. Per i pazienti a rischio si consiglia il campionamento almeno due o tre volte la settimana.
- Sono stati riscontrati esiti positivi nei pazienti emodializzati (12,13), e inoltre in soggetti trattati con taluni emoprodotti frazionati, come sieroalbumina e immunoglobuline (19) e in campioni o soggetti trattati con garze contenenti glucano. Per il ripristino ai valori basali dei livelli di (1→3)-β-D-glucano nel siero, i pazienti richiedono 3 – 4 giorni di tempo dopo esposizione chirurgica a spugne e garze contenenti (1→3)-β-D-glucano (6). Tutto questo deve essere considerato al momento di stabilire la tempistica di campionamento per i pazienti della chirurgia.
- Non sono accettabili campioni ottenuti con puntura del tallone o del dito, in quanto la garza imbevuta di alcool usata sulla cute (e potenzialmente anche l'accumulo di sangue sull'epidermide) si è dimostrata una fonte di contaminazione per i campioni.
- I livelli del test sono stati determinati su soggetti adulti. Per quanto riguarda i pazienti in età infantile e pediatrica, i livelli normali non variano molto rispetto agli adulti (21). Mancano invece dati per neonati e per bambini di meno di sei mesi.
- Il range riferibile di questo saggio va da 31 pg/mL a 500 pg/mL. Valori inferiori a 31 pg/mL vanno riferiti come < 31 pg/mL; valori >500 pg/mL devono essere riferiti come > 500 pg/mL.

## SOSTANZE INTERFERENTI

Le seguenti condizioni dei campioni possono interferire con la precisione dei risultati forniti dal saggio Fungitell:

- Emolisi
- Torbidità dei campioni a causa di lipemia
- Presenza macroscopica di bilirubina
- Siero torbido

### VALORI ATTESI

Varie micosi sono caratterizzate da valori elevati di beta glucano. In presenza di segni e sintomi a un livello di 80 pg/mL o più, il valore predittivo per la positività di un soggetto alla micosi va da 74,4 a 91,7% (Tabella 2). In assenza di segni e sintomi a meno di 60 pg/mL, i valori predittivi della negatività erano fra 65,1% e 85,1%.

## CARATTERISTICHE DI RENDIMENTO

**Analisi comparativa**

È stato eseguito uno studio prospettico e multicentrico a convalida delle caratteristiche di rendimento del saggio Fungitell. Quest'ultimo è stato rapportato ad altre metodiche standard di rilevamento (ossia emocoltura, esame istopatologico di campione bioptico e segni radiologici) per micosi e fungemie.

Fungitell

Trecentocinquantanove (359) soggetti sono stati testati con il saggio. Ogni soggetto ha fornito un singolo campione. I soggetti a basso rischio comprendevano persone apparentemente sane, oppure ricoverate presso centri clinici per motivi diversi dalle micosi. I soggetti sono stati arruolati presso sei centri clinici negli Stati Uniti. Quattro di questi centri hanno eseguito il saggio, testando un totale di 285 campioni. ACC ha testato due volte tutti i 359 campioni, ma usando solo il secondo set di esiti per determinare il rendimento del saggio. I risultati di questo secondo set di analisi non differivano statisticamente da quelli del primo set.

Fungitell

La sensibilità per l'intera popolazione di soggetti (359), compreso *Cryptococcus*, era del 65,0% (Intervallo di confidenza (IC) 60,1 – 70,0%). La specificità era dell'81,1% (IC 77,1 – 85,2%) (Tabella 1). Gli esiti ottenuti dai quattro centri di test mostravano un campo di sensibilità fra 50,0% e 66,7%. La specificità andava da 70,0% a 93,0% per i 285 campioni testati (Tabella 2).

Tabella 1 Esiti del test ACC al livello di cut-off di 60-80 <span> </span> pg/mL, per centro								
Centro	Attestato/Probabile Sensibilità >=80pg/mL			Specificità <60pg/mL			Equivoco 60<=X<80	Totale
	Pos/Pos. clin.	Sensibilità	Valore positivo predittivo	Neg/Neg. clin.	Specificità	Valore negativo predittivo		
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	N/P	0/0	N/P	0,0	0	1
Totale*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Fungitell

**\*Include un solo campione dal Centro 6.**

Rapportando alla diagnosi clinica gli esiti ottenuti da ACC (359 campioni) e dai centri clinici (285 campioni), la sensibilità è pari a 64,3% (IC 58,8% - 69,9%) per ACC e a 61,5% (IC 55,9% - 67,2%) per i centri. La specificità equivale a 86,6% (IC 82,7% - 90,6%) per ACC contro 79,6% (IC 74,9% - 84,3%) per i centri (Tabella 2).

Fungitell

Tabella 2 Esiti dai centri di test, al livello di cut-off di 60-80 <span> </span> pg/mL, per centro								
Centro	Attestato/Probabile Sensibilità >=80pg/mL			Specificità <60pg/mL			Equivoco 60<=X<80	Totale
	Pos/Pos. clin.	Sensibilità	Valore positivo predittivo	Neg/Neg. clin.	Specificità	Valore negativo predittivo		
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 *								
Totale, centri	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

Fungitell

**\* Non un centro di test**

### CANDIDOSI

Durante lo studio prospettico, a 107 soggetti è stata diagnosticata con certezza una candidosi. 83 di loro hanno dato esito positivo nel saggio Fungitell.

Fungitell

175 campioni provenienti dalla libreria per la candidosi sono stati forniti alla Associates of Cape Cod. 145 di essi sono risultati positivi nel saggio.

Fungitell

### ASPERGILLOSI

Un totale di 10 soggetti si è dimostrato positivo nei riguardi dell'aspergilloso. 8 di tali soggetti sono risultati positivi con il saggio.

Fungitell

### FUSARIOSI

Tre soggetti erano positivi per la fusariosi e 2 di essi sono risultati tali con il saggio.

Fungitell

### FARMACOTERAPIA ANTIMICOTICA

La presenza o l'assenza di farmacoterapia antimicotica non ha avuto un effetto statisticamente significativo sulla sensibilità del saggio. 118 soggetti sono stati accertati come positivi per infezione fungina invasiva ed erano in terapia antimicotica. 82 erano positivi con il saggio (sensibilità, 69,5%; IC 61,2% - 77,8%). Inoltre, ventiquattro (24) soggetti sono stati accertati come positivi ma non assumevano terapia antimicotica. 18 erano positivi sulla base del saggio (sensibilità, 75%; IC 57,7% - 92,3%).

### SPECIFICITÀ

Un totale di 170 soggetti è risultato negativo per l'infezione micotica e versava in condizioni di salute apparentemente buone. La specificità era dell'86,5% con il saggio (IC 82,8% - 90,1%). Con l'inclusione di altri 26 soggetti negativi per tali infezioni ma affetti da altri disturbi, la specificità è passata all'81,1% (IC 77,1 – 85,2 %).

Fungitell

### CORRELAZIONI FRA TEST

Quattro dei centri clinici hanno dosato un totale di 285 campioni. Gli esiti si correlavano in termini quantitativi al 96,4% con i risultati ottenuti dalla Associates of Cape Cod. Le correlazioni della Associates of Cape Cod rispetto ai vari centri di test andavano da 90,6 a 99,2%.

## PRECISIONE

Negli studî sulla precisione, dieci (10) diversi campioni sono stati testati individualmente da tre centri, in tre diverse giornate. La variazione intra-saggio andava da 0,9 a 28,9%. I valori inter-saggio erano invece fra 3,9 e 23,8%. I quattro (4) campioni negativi sono stati esclusi da entrambe le analisi.

Fungitell

- 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* ameboocyte 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.

Fungitell

#### ULTERIORI FONTI BIBLIOGRAFICHE NON CITATE

- 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. Immunno. 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.

Fungitell

Fungitell

Fungitell

#### LEGENDA DEI SIMBOLI

<span></span>	<b>“Scad.”</b>
<span></span>	<b>“Contenuto sufficiente per ‘N’ test”</b>
<span></span>	<b>“Cod. lotto”</b>
<span></span>	<b>“Dispositivo medico per uso diagnostico in vitro”</b>
<span></span>	<b>“N° catalogo”</b>
<span></span>	<b>“Temperatura limite”</b>
<span></span>	<b>“Produttore”</b>
<span></span>	<b>“Leggere le istruzioni per l'uso”</b>
<span></span>	<b>“Rappresentante autorizzato”</b>
<span></span>	<b>“Marchio CE”</b>
<span></span>	<b>“Associates of Cape Cod® International, Inc. Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Regno Unito</b>