

Bepaling van (1→3)-β-D-glucan in serum

FUNGITELL®		
Gebruiksaanwijzing		
ASSOCIATES OF CAPE COD INCORPORATED	<p>Telefoon: +1 508 540-3444</p> <p>Gratis (VS): +1 888 395-2221</p> <p>Fax: +1 508 540-8680</p> <p>Technische Ondersteuning: +1 800 848-3248</p> <p>Klantenservice: +1 800 525-8378</p>	<p>42</p> <p></p> <p></p>
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536		
PN001268-nl		Rev 000, herzien december 2007

BEOOGD GEBRUIK

De Fungitell-test is een protease-zymogeen gebaseerde, colorimetrische bepaling voor de kwalitatieve detectie van (1→3)-β-D-glucan in het serum van patiënten die symptomen hebben van of medische aandoeningen hebben die de patiënt vatbaar maken voor een invasieve schimmelinfectie. De serumconcentratie van (1→3)-β-D-glucan, een belangrijk bestanddeel van de celwand van verschillende medisch belangrijke schimmels, kan gebruikt worden als hulpmiddel bij de diagnose van hardnekkige mycosen en fungemieën. Een positief resultaat geeft niet aan door welke groep schimmels de infectie mogelijk veroorzaakt wordt.

De bepaling is aangewezen voor de diagnose van een vermoedelijke schimmelinfectie. Ze dient gebruik te worden samen met andere diagnostische procedures zoals microbiologische kweken, histologisch onderzoek van biopsiemonsters, en radiologisch onderzoek.

Belangrijk – Het verdient aanbeveling deze informatie aan de aanvragende arts te geven:
De Fungitell-test detecteert bepaalde schimmelsoorten niet. Dit is het geval voor het genus <i>Cryptococcus</i> (9) dat erg kleine hoeveelheden (1→3)-β-D-glucan produceert. De bepaling detecteert ook geen zygomyceten, zoals <i>Absidia</i> , <i>Mucor</i> en <i>Rhizopus</i> (17) waarvan men niet weet of ze (1→3)-β-D-glucan produceren. Bovendien produceert de gistfase van <i>Blastomyces dermatitidis</i> weinig (1→3)-β-D-glucan en detecteert de test dit mogelijk niet (18).
Deze verklaring dient bij de rapportering van de resultaten van de Glucan-test opgenomen te worden.

SAMENVATTING EN UITLEG

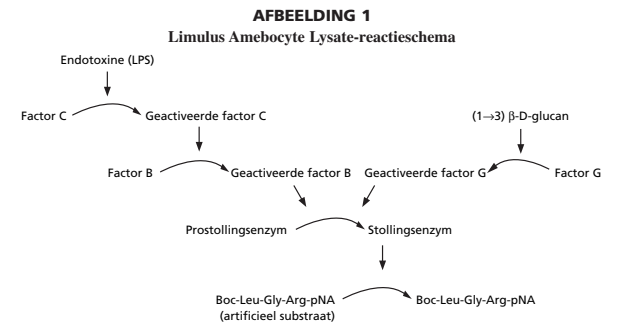
Er is een toenemend aantal schimmelinfecties door zowel primaire als opportunistische pathogenen, vooral bij patiënten met een gecompromiteerd immuunsysteem (2, 3, 4). Invasieve schimmelziekten, in de vorm van opportunistische infecties, komen regelmatig voor bij patiënten met hematologische maligniteiten en AIDS en veroorzaken een toenemend aantal nosocomiale infecties, met name bij patiënten die een orgaantransplantatie hebben ondergaan en andere patiënten die met immunosuppressiva behandeld worden (1, 4). Veel schimmelziekten worden opgelopen door inademing van schimmelsporen die afkomstig zijn van de aarde, plantaardig afval, luchtbehandelingsystemen en/of blootgestelde oppervlakken. Sommige opportunistische schimmels bevinden zich op de menselijke huid, in het darmkanaal en op de slijmvliezen (7). De diagnose van invasieve mycosen en fungemieën gebeurt gewoonlijk op basis van niet-specifieke diagnostische of radiologische technieken.

Vaak voorkomende primaire humane fungale pathogenen zijn *Candida* spp. en *Aspergillus* spp. Opportunistische fungale pathogenen zijn onder andere *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium* spp., *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* en *Pneumocystis carinii*. Het (1→3)-β-D-glucan dat door deze organismen en andere geproduceerd wordt, kan door de Fungitell-test gedetecteerd worden (4, 5, 16).

WERKINGSPRINCIPE

De Fungitell-test meet concentraties van (1→3)-β-D-glucan. De bepaling is gebaseerd op een modificatie van het *Limulus* Amebocyte Lysaat (LAL) (8-11), afbeelding 1. Het Fungitell-reagens is zo gemodificeerd dat factor C geëlimineerd is en dus alleen reageert op (1→3)-β-D-glucan, via het door factor G-gemedieerde deel van de reactieketen.

(1→3)-β-D-Glucan activeert factor G, een serine protease zymogeen. De geactiveerde factor G zet het inactieve prostollingsenzym om in het actieve stollingsenzym, dat op zijn beurt pNA van het chromogene peptidesubstraat, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, knipt waardoor een chromofoor gecreëerd wordt dat bij 405 nm absorbeert. De kinetische Fungitell-test, die hieronder beschreven wordt, is gebaseerd op de bepaling van de snelheid waarmee de optische dichtheid in het monster toeneemt. Deze snelheid wordt vergeleken met een standaardcurve om een schating te krijgen van de concentratie (1→3)-β-D-glucan in het monster.



MATERIALEN DIE BIJ DE FUNGITELL-KIT GELEVERD WORDEN

De Fungitell-kit is bestemd voor *in vitro* diagnostiek. De volgende materialen, die bij iedere kit geleverd worden, zijn voldoende om 110 wells in twee microtiterplaten (55 wells op iedere plaats) te testen.

- Fungitell®-reagens, een gelyofiliseerd (1→3)-β-D-glucan specifiek LAL (twee flesjes)
- Pyrosol-reconstitutiebuffer, Tris HCl 0,2 M, pH 7,4 (twee flesjes)
- Glucan standaard, gelyofiliseerd pachyman en inert vulmiddel. De (1→3)-β-D-glucan inhoud wordt op het etiket vermeld (twee flesjes)
- Reagent grade water (RGW) (twee flessen)
- Pyroplates: platte bodem, 96 wells, ongecoate microtiterplaten, met deksel, zonder interfererend glucan (twee stuks)
- KCl 1,2 M (één flesje)
- KOH 0,25 M (één flesje)

Alle hierboven vermelde materialen zijn, met uitzondering van de standaard, vrij van storende hoeveelheden (1→3)-β-D-glucan.

BENODIGDE MAAR NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

Alle materialen moeten vrij zijn van glucan. Het glaswerk moet met droge hitte op ten minste 235 °C gedurende 7 uur gedepyrogeneerd zijn (of een gevalideerd equivalent hiervan) voordat het geschikt is voor gebruik.

- Pipettips* (250 µl – Catnr. PPT25, 1000 µl – Catnr. PPT10).
- Pipetten die een volume van 5-25 µl en 100-1000 µl kunnen afgeven
- Verdeelpipet, met spuittips, die 100 µl kunnen afgeven.
- Testbuisjes* voor bereiden standaardserie en combineren van reagentia voor serumbehandeling (13 x 100 mm borosilicaatglas – Catnr. TB013).
- Microtiterplaatlezer met incubator (37 °C) met twee golf lengten, 405 en 490 nm, met een dynamisch bereik van ten minste 2,0 absorbtantie-eenheden, samen met geschikte kinetische analysesoftware.
- Steriele, glucan-vrije, opslagbuizen met schroefdoop voor het verdelem van monsters (de meeste buizen die gecertificeerd RNAse-, DNAse- en pyrogeenvrij zijn, zijn vrij van storende hoeveelheden (1→3)-β-D-glucan).
- Parafilm®.

* Deze producten, die geleverd worden door Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), zijn gecertificeerd vrij van storende hoeveelheden glucans.

Pas op – glazen pipetten met katoenen plugs vormen een mogelijke bron van glucancontaminatie.

WAARSCHUWINGEN EN VOORZORGSMAATREGELEN

Dit product is bestemd voor IN VITRO DIAGNOSTIEK.

De Fungitell-test vereist strenge aandacht voor de techniek en de testomgeving. Een gedegen opleiding van de uitvoerder en het vermijden van contaminatie is van cruciaal belang voor de effectiviteit van de assay.
--

- Species die niet door de Fungitell-assay gedetecteerd worden. Bepaalde schimmelspecies produceren erg lage concentraties (1→3)-β-D-glucan die gewoonlijk niet door de Fungitell-assay ontdekt worden. Hiertoe behoren het genus *Cryptococcus* (14, 16) en de zygomyceten zoals *Absidia*, *Mucor* en *Rhizopus* (16, 17). Bovendien produceert *Blastomyces dermatitidis*, in gistvorm kleine hoeveelheden (1→3)-β-D-glucan en wordt daarom gewoonlijk niet gedetecteerd door de Fungitell-test (18).
- Pipetteer niet met de mond. Rook, eet of drink niet in ruimten waar met monsters of reagentia uit de kit wordt gewerkt.
- Zorg dat de ruimte waarin de assay wordt uitgevoerd, schoon is. Gebruik materialen en reagentia die gecertificeerd vrij zijn van storende hoeveelheden (1→3)-β-D-glucan. Vergeet niet dat glucan en fungale verontreiniging van het menselijke lichaam, kleding, containers, water, en door de lucht verspreid stof ,de Fungitell-assay nadelig kan beïnvloeden.
- Gebruik de reagentia niet nadat de houdbaarheidsdatum is verstreken.

- Verkleurde of troebele monsters zoals monsters die zwaar gehemolyseerd of lipemisch zijn of een overmaat aan bilirubine bevatten, kunnen de test beïnvloeden. Na de test dienen de testresultaten onderzocht te worden op bewijs van optische interferentie en/of ongebruikelijke kinetische sporenpatronen.
- Gebruik geschikte beschermende kleding en poedervrije handschoenen bij het hanteren van patiëntenmonsters.
- Het serum van hemodialysepatiënten kan hoge concentraties (1→3)-β-D-glucan bevatten als gebruik gemaakt wordt van bepaalde cellulose dialysemembranen (13). Hemodialyse met membranen van cellulosetriacaat of polymethylmethacrylaat lijken de bepaling niet te beïnvloeden.
- Chirurgische gaasjes en sponzen kunnen hoge concentraties (1→3)-β-D-glucan vrijgeven, waardoor een bijdrage geleverd wordt aan een door verontreiniging veroorzaakt transient positief resultaat op de Fungitell-test zoals in postoperatieve patiënten waargenomen is (6).
- Kits met beschadigde inhoud mogen niet gebruikt worden.
- Materialen die aan potentieel verontreinigde (met pathogenen) vloeistoffen zijn blootgesteld moeten in overeenstemming met de plaatselijke regels afgevoerd worden.

Opslag van reagentia

Sla alle reagentia zoals geleverd bij 2-8 °C in het donker op. Opgelost Fungitell-reagens moet bij 2-8 °C bewaard worden en moet binnen 2 uur gebruikt worden. Opgelost Fungitell-reagens kan ook maximaal 20 dagen ingevroren worden bij -20 °C; het mag eenmaal ontdooid en gebruikt worden.

Behandeling van de monsters

- Monsternaam: Serummonsters dienen in steriele vacuüm buisjes (rode doppen) of serumscheidingsbuisjes (SST) verzameld te worden, waarna ze moeten stollen. Het serum wordt vervolgens van het stolsel gescheiden en afgeschonken in een geschikte container die vrij is van storende hoeveelheden (1→3)-β-D-glucan.
- Opslag van de monsters: Monsters mogen vóór de assay bij 2-8 °C bewaard worden of moeten bij -20 ° of kouder ingevroren worden.
- Labeling van de monsters: Monsters moeten duidelijk gelabeld worden volgens de goedgekeurde praktijken van de instelling.

WERKWIJZE

Opmerking: De instellingen variëren met de gebruikte instrumenten en software. In het algemeen zijn de volgende voorschriften van toepassing: Stel de plaatlezersoftware zo in dat hij gegevens verzamelt in deodus Vmean (Vgemiddeld). Raadpleeg de handleiding van de software voor de juiste instellingen om er zeker van te zijn dat de berekende waarde de gemiddelde snelheid is waarmee de optische dichtheid verandert voor alle verzamelde datapunten. Het interval waarmee de optische dichtheid gelezen wordt moet 15 – 30 seconden zijn. De golflengte-instelling in de software moet 405 nm zijn minus de achtergrond bij 490 nm. Als een aflezing bij dubbele golflengte onmogelijk is, leest u op 405 nm. De incubatietemperatuur moet op 37 °C ingesteld worden. De plaat moet gedurende 5 – 10 seconden vóór de aflezing geschud worden. De regressieanalyse moet op lineair/lineair of equivalent daaraan ingesteld worden. De aflezing moet zonder lag-tijd beginnen.

- Bereiding van de glucanstandaard die in de kit is meegeleverd.
 - Los één flesje met glucanstandaard op met het volume RGW dat op de flacon wordt aangegeven tot een concentratie van 100 pg/ml. Vortex ten minste 30 seconden om de bestanddelen opnieuw in suspensie te brengen (oplossing 1). De glucanoplossing dient bij 2-8 °C bewaard te worden en moet binnen drie dagen worden gebruikt. Stap b-e hieronder illustreren een voorbeeld van een standaardcurve bereidingschema.
 - Bereid 50 pg/ml standaard door 500 µl RGW en 500 µl oplossing 1 in een glucan-vrije buis te mengen (oplossing 2). Vortex ten minste 10 seconden.
 - Bereid 25 pg/ml standaard door 500 µl RGW en 500 µl oplossing 2 in een glucan-vrije buis te mengen (oplossing 3). Vortex ten minste 10 seconden.
 - Bereid 12,5 pg/ml standaard door 500 µl RGW en 500 µl oplossing 3 in een glucan-vrije buis te mengen (oplossing 4). Vortex ten minste 10 seconden.
 - Bereid 6,25 pg/ml standaard door 500 µl RGW en 500 µl oplossing 4 in een glucan-vrije buis te mengen (oplossing 5). Vortex ten minste 10 seconden.
- Bereiding van reagens voor de voorbehandeling van serum. Het alkaline reagens voor voorbehandeling van het serum zet glucans met een drievoudige helix om in glucans met één enkele streng(10,11) die reactiever zijn in de assay. De hoge pH inactieveert bovendien de serineproteases en de serineproteaseremmers in serum die respectievelijk een fout-positief of een fout-negatief resultaat kunnen veroorzaken (20).
 - Bereid het reagens voor de voorbehandeling van het serum door gelijke volumes 0,25 M KOH en 1,2 M KCl samen te mengen en goed te vortexen. De aanbevolen volumes zijn maximaal 900 µl van ieder reagens, voor maximaal twee bereidingen. Dek de flesjes die met de tweede plaat gebruikt worden af met Parafilm. Bedek de flesjes met de zijde van de Parafilm die naar het schutvel gekeerd was.

- Opmerking: Bij het uitzetten van de standaardcurve vermenigvuldigt u de concentratie van de standaarden met vijf, zodat het bereik loopt van 500 tot 31 pg/ml. Voer de standaarden in de software respectievelijk in als 500, 250, 125, 62,5 en 31 pg/ml.

Het volume van de standaard in de assay is 25 µl per well of vijf maal het volume van het serummonster. De microtiterplaat met de standaarden (St), negatieve controles (Neg) en 21 onbekende monsters (Onb), die elk in tweevoud getest worden, is als volgt opgezet:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		St1	St1		Onb1	Onb4	Onb7	Onb10	Onb13	Onb16	Onb19	
C		St2	St2		Onb1	Onb4	Onb7	Onb10	Onb13	Onb16	Onb19	
D		St3	St3		Onb2	Onb5	Onb8	Onb11	Onb14	Onb17	Onb20	
E		St4	St4		Onb2	Onb5	Onb8	Onb11	Onb14	Onb17	Onb20	
F		St5	St5		Onb3	Onb6	Onb9	Onb12	Onb15	Onb18	Onb21	
G		Neg	Neg		Onb3	Onb6	Onb9	Onb12	Onb15	Onb18	Onb21	
H												

Opmerking 1: De wells aan de buitenkant mogen gebruikt worden als is aangetoond dat de prestaties van de buitenste wells vergelijkbaar is met die van de wells aan de binnenkant van de microtiterplaat.

Opmerking 2: Om onbedoelde verontreiniging te voorkomen, dient u de microplaat af te dekken nadat de monsters en reagentia in de wells geplaatst zijn. Verwijder het deksel voordat u de plaat in de lezer plaatst om optische interferentie door condensatie te voorkomen.

- Toevoeging van het serum en het reagens voor de voorbehandeling.
 - Ontdooi bevroren serummonsters bij kamertemperatuur. Vortex alle monsters goed.
 - Breng 5 µl van het serummonster over in elk van de daarvoor bestemde wells (Onb); doe dit ten minste in tweevoud. Herhaal deze stap voor elk serummonster.
 - Voeg 20 µl van het reagens voor de voorbehandeling van het serum toe aan iedere well die serum bevat. *Opmerking:* Stap b en c kunnen naar voorkeur van de technicus in omgekeerde volgorde worden uitgevoerd.
 - Schud de plaat gedurende 5 – 10 seconden om de inhoud van de well goed te mengen (u kunt hiervoor de schudfunctie van de lezer gebruiken) en laat de monsters gedurende 10 minuten bij 37 °C incuberen in de incubatie-plaatlezer.
- Oplossen van het Fungitell-reagens. *Opmerking:* Dit kan gemakkelijk uitgevoerd worden tijdens de voorbehandelingsincubatie.
 - RLos één flesje Fungitell-reagens op door 2,8 ml RGW toe te voegen en vervolgens 2,8 ml Pyrosol-reconstitutiebuffer toe te voegen met behulp van de 1000 µl-pipet. Bedek de flesjes met de zijde van de Parafilm die naar het schutvel gekeerd was. Draai het flesje voorzichtig rond om de inhoud volledig op te lossen – niet vortexen.
- Toevoeging van de negatieve controles en glucanstandaarden. Aan het eind van de incubatie van het voorbehandelde serum (stap 3d) verwijdert u de plaat uit de incubatie-plaatlezer en voegt de standaarden en negatieve controles aan de plaat toe.
 - Voeg 25 µl RGW toe aan wells G2 en G3.
 - Voeg 25 µl van de 6,25 pg/ml standaardoplossing 5 toe aan wells F2 en F3.
 - Voeg 25 µl van de 12,5 pg/ml standaardoplossing 4 toe aan wells E2 en E3.
 - Voeg 25 µl van de 25 pg/ml standaardoplossing 3 toe aan wells D2 en D3.
 - Voeg 25 µl van de 50 pg/ml standaardoplossing 2 toe aan wells C2 en C3.
 - Voeg 25 µl van de 100 pg/ml standaardoplossing 1 toe aan wells B2 en B3.
- Toevoeging van Fungitell-reagens en plaatincubatieprocedure.
 - Voeg met de stepper-pipet 100 µl Fungitell-reagens toe aan iedere well (met negatieve controles, standaards en monsters).
 - Plaats de plaat in de microplaatlezer (op temperatuur van 37 °C gebracht) met het deksel erop en schud 5-10 seconden. Lees de plaat zonder deksel bij 405 nm minus 490 nm gedurende 40 minuten bij 37 °C. Als de achtergrondcorrectie (op 490 nm) niet beschikbaar is, mag bij 405 nm gelezen worden. Als de plaatschudfunctie niet beschikbaar is bij de microplaatlezer, kan een afzonderlijke microplaatshudder gebruikt worden.
 - Verzamel de gegevens en analyseer ze als volgt: bereken de gemiddelde snelheid waarmee de optische dichtheid verandert (milliabsorbtantie-eenheden per minuut) voor alle punten tussen 0 en 40 minuten.

INTERPRETATIE VAN DE RESULTATEN

De Fungitell-testresultaten moeten gebruikt worden als hulpmiddel bij de diagnose van een invasieve schimmelinfectie. De resultaten worden uitgedrukt in pg/ml serum en variëren van niet-detecteerbaar (<31 pg/ml) tot > 500 pg/ml en worden afgedrukt door de software of gelezen van de standaardcurve. Bij nauwkeurige waarden boven 500 pg/ml moet het monster met RGW verdund worden en opnieuw worden getest.

Het laboratorium dat de test verricht moet de aanvragende arts informeren dat de Fungitell-test bepaalde schimmelspecies niet ontdekt; dit geldt onder andere voor het genus *Cryptococcus* (16, 17) dat erg kleine hoeveelheden of (1→3)-β-D-glucan produceert. De test detecteert ook geen zygomyceten, zoals *Absidia*, *Mucor* en *Rhizopus* (16, 17) waarvan men niet weet of ze

(1→3)-β-D-glucan produceren. Op dezelfde manier produceert *Blastomyces dermatitidis* in de gistfase weinig (1→3)-β-D-glucan, dat gewoonlijk niet gedetecteerd kan worden (18).

NEGATIEF RESULTAAT

(1→3)-β-D-glucan-waarden < 60 pg/ml worden geïnterpreteerd als een negatief resultaat.

POSITIEF RESULTAAT

Waarden >80 pg/ml worden geïnterpreteerd als een positief resultaat. Een positief resultaat betekent dat (1→3)-β-D-glucan gedetecteerd is. Een positief resultaat betekent niet dat een ziekte aanwezig is; een dergelijk resultaat moet samen met andere klinische bevindingen gebruikt worden om een diagnose te stellen.

ONBEPAALD RESULTAAT

Waarden tussen 60 en 79 pg/ml duiden op een mogelijke schimmelinfectie. Het verdient aanbeveling aanvullende monsters af te nemen en de sera te testen. Veelvuldige monsterafnames en tests verbeteren de bruikbaarheid voor het stellen van de diagnose.

KWALITEITSCONTROLE

- De correlatiecoëfficiënt (r) van de standaardcurve (lineair vs. lineair) moet > 0,980 zijn.
- De wells met 25 µl RGW zijn de negatieve controles. Negatieve controles dienen een feitelijke waarde voor de optische dichtheidssnelheid (Vgemiddeld) te hebben van minder dan 50% van de laagste standaard. Als dit niet het geval is, moet de bepaling herhaald worden met behulp van geheel nieuwe reagentia.
- Behandeling van probleemmonsters. Als de analist een nevelig, verkleurd of troebel monster aantreft, zoals monsters die zwaar gehemolyseerd of lipemisch zijn of een overmaat aan bilirubine bevatten, moet het monster met RGW verdund worden en opnieuw worden getest. De verduunning moet bij het rapporteren van de resultaten verrekend worden door het resultaat te vermenigvuldigen met de verduunningsfactor. De verduunningsfactor wordt gewoonlijk in de software ingevoerd voor het monster, zodat deze correctie automatisch wordt uitgevoerd.
- Controlemonsters kunnen, bij de grens- en hoogpositieve waarden, meegenomen worden om te controleren of de reagentia en de assay naar behoren functioneren. Iedere gebruiker van de test dient een kwaliteitscontroleprogramma op te stellen om te verzekeren dat de test vakkundig wordt uitgevoerd.

BEPERKINGEN VAN DE TEST

- De weefsellocatie van de schimmelinfectie (10), inkapseling en de hoeveelheid (1→3)-β-D-glucan die door bepaalde schimmels geproduceerd wordt, kunnen de serumconcentratie van deze parameter beïnvloeden. Een kleiner vermogen om (1→3)-β-D-glucan aan de bloedstroom af te geven, kan leiden tot een kleiner vermogen om bepaalde schimmelinfecties te ontdekken. *Cryptococcus* spp. produceert kleine hoeveelheden (1→3)-β-D-glucan (11) door inkapseling van de cel. Van zygomyceten, zoals *Absidia*, *Mucor* spp. en *Rhizopus* spp. (16, 17) weet men niet of ze (1→3)-β-D-glucan (16, 17) produceren. *Blastomyces dermatitidis*, in de gistfase, produceert weinig (1→3)-β-D-glucan en de testresultaten zijn gewoonlijk negatief (18).
- Sommige personen hebben een verhoogde concentratie (1→3)-β-D-glucan die in de onbepaalde zone valt. In dergelijke gevallen wordt aanbevolen aanvullende test te doen.
- De frequentie waarmee patiënten getest worden is afhankelijk van het relatieve risico van een schimmelinfectie. Een bemonsteringsfrequentie van ten minste twee tot drie keer per week wordt aanbevolen voor patiënten die een hoog risico lopen.
- Positieve resultaten zijn gevonden bij hemodialysepatiënten (12, 13), patiënten die behandeld zijn met bepaalde gefractioneerde bloedproducten zoals serumalbumine en immunoglobulines (19) en in monsters of patiënten die zijn blootgesteld aan gas dat glucan bevat. Patiënten hebben 3 – 4 dagen nodig om hun baselineconcentratie (1→3)-β-D-glucan in serum te herstellen na chirurgische blootstelling aan sponzen en gaasjes die (1→3)-β-D-glucan bevatten (6). Bij de timing van de monsterafname bij patiënten die een operatie hebben ondergaan, dient hiermee dus rekening te worden gehouden.
- Monsters die met een hiel- of vingerprik verzameld zijn, zijn niet aanvaardbaar, omdat is aangetoond dat het met alcohol doortrokken gaasje dat gebruikt wordt om de aanpriklplaats te reinigen (en mogelijk de opeenhoping van bloed op de huid) de monsters verontreinigen.
- Testwaarden zijn bij volwassen patiënten bepaald. De normale waarden voor baby's en kinderen benaderen die van volwassenen (21). Er zijn geen gegevens voor pasgeborenen en baby's van jonger dan zes maanden beschikbaar.
- Het rapporteerbare bereik van de assay is van 31 pg/ml tot 500 pg/ml. Waarden onder 31 pg/ml dienen gerapporteerd te worden als < 31 pg/ml. Waarden >500 pg/ml dienen gerapporteerd te worden als > 500 pg/ml.

STORENDE SUBSTANTIES

De volgende monstercondities kunnen de nauwkeurigheid van de resultaten van een Fungitell-assay nadelig beïnvloeden:

- Hemolyse
- Troebelheid van het monster veroorzaakt door lipemie
- De aanwezigheid van visueel zichtbaar bilirubine
- Troebel serum

TE VERWACHTEN UITSLAGEN

Bij een aantal verschillende schimmelinfecties zijn de beta-glucan-waarden verhoogd. Als tekenen en symptomen aanwezig zijn op een niveau van 80 pg/ml of hoger, varieert de voorspellende waarde dat de patiënt positief is voor een schimmelinfectie van 74,4 tot 91,7% (tabel 2). In de afwezigheid van tekenen en symptomen op een niveau van minder dan 60 pg/ml, varieert de negatieve voorspellende waarde van 65,1% tot 85,1%.

PRESTATIEKENMERKEN

Vergelijkende tests

Er is een multicenter prospectief onderzoek uitgevoerd om de prestatiekenmerken van de Fungitell-assay te valideren. De test werd vergeleken met andere standaard detectiemethoden (d.w.z. bloedweek, histopathologisch onderzoek van biopsiemonsters en radiologisch onderzoek) voor mycosen en fungemieën.

Driehonderdnegeenvijftig (359) patiënten werden met de bepaling getest. Van iedere patiënt werd één monster verzameld. De patiënten met laag risico waren schijnbaar gezonde personen en patiënten die in het ziekenhuis waren opgenomen om andere redenen dan een schimmelinfectie. Patiënten werden bij zes klinische centra in de Verenigde Staten geworven. Vier van de klinische centra voerden de bepaling uit en testten in totaal 285 monsters. ACC testte alle 359 monsters twee keer, maar gebruikte alleen de tweede set met resultaten om de prestatie van de assay te bepalen. De resultaten van de tweede analyseset waren statistisch niet significant verschillend van de eerste set.

De gevoeligheid van de hele patiëntenpopulatie (359), inclusief *Cryptococcus*, was 65,0% (60,1 – 70,0% betrouwbaarheidsinterval (BI)). De specificiteit was 81,1% (77,1 – 85,2 % BI) (tabel 1). De resultaten van de vier testcentra hadden een gevoeligheidsbereik van 50,0% tot 66,7%. De specificiteit varieerde van 70,0% tot 93,0% voor de 285 monsters die getest waren (tabel 2).

Tabel 1 ACC-testresultaten voor de grenswaarde van 60-80 pg/ml per centrum								
Centrum	Aangetoonde/waarschijnlijke Gevoeligheid >=80 pg/ml			Specificiteit <60 pg/ml			Onbepaald 60 < X < 80	Totaal
	Pos/klin. pos	Gevoeligheid	Positieve voorspellende waarde	Neg/klin. neg	Specificiteit	Negatieve voorspellende waarde		
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.v.t.	0/0	N.v.t.	0,0	0	1
Totaal*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

*Omvat één monster van centrum 6.

Wanneer de resultaten die door ACC (359 monsters) en door de klinische centra (285 monsters) verkregen zijn, vergeleken worden met de klinische diagnose, is de sensitiviteit 64,3% (58,8% - 69,9% BI) voor ACC en 61,5% (55,9% - 67,2% BI) voor de centra. De specificiteit is 86,6% (82,7% - 90,6% BI) voor ACC versus 79,6% (74,9% - 84,3% BI) voor de centra (tabel 2).

Tabel 2 Resultaten van de testcentra voor de grenswaarde van 60-80 pg/ml per centrum								
Centrum	Aangetoonde/waarschijnlijke Gevoeligheid >=80 pg/ml			Specificiteit <60 pg/ml			Onbepaald 60 < X < 80	Totaal
	Pos/klin. pos	Gevoeligheid	Positieve voorspellende waarde	Neg/klin. neg	Specificiteit	Negatieve voorspellende waarde		
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 *								
Total, Sites	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

*** Geen testcentrum**

CANDIDIASIS

In het prospectieve onderzoek waren 107 patiënten die positief gediagnosticeerd weren met candidiasis. 83 van de 107 waren positief op de Fungitell-assay.

Honderdvijfenzeventig candidiasismonsters uit de monsterbank werden aan Associates of Cape Cod geleverd. 145 van de 175 testten positief op de assay.

ASPERGILLOSIS

In totaal testten 10 patiënten positief voor aspergillosis. 8 van de 10 testten positief op de assay.

FUSARIOSIS

Drie patiënten testten positief voor fusariosis. 2 van de 3 testten positief op de assay.

BEHANDELING MET ANTIFUNGALE GENEESMIDDELEN

De aan- of afwezigheid van een behandeling met antifungale geneesmiddelen had geen statistisch significant effect op de gevoeligheid van de test. Van 118 patiënten die met antifungale middelen behandeld werden, werd aangetoond dat ze positief waren voor een invasiee schimmelinfectie. 82 waren positief op de assay (gevoeligheid, 69,5%; 61,2% - 77,8% BI). Bovendien werd van vierentwintig (24) patiënten die geen antifungale middelen kregen, aangetoond dat ze positief waren. 18 testten positief op de assay (gevoeligheid, 75%; 57,7% - 92,3% BI).

SPECIFICITEIT

In totaal testten 170 patiënten die schijnbaar gezond waren negatief voor een schimmelinfectie. De specificiteit van de assay was 86,5% (82,8% - 90,1% BI). Wanneer nog eens 26 patiënten, die negatief testten voor een schimmelinfectie maar andere aandoeningen hadden, werden meegenomen in de analyse, werd een specificiteit van 81,1% geobserveerd (77,1 – 85,2 % BI).

TESTCORRELATIES

In totaal werden in vier klinische centra 285 monsters getest. De centrumresultaten correleerden 96,4% met de resultaten van de resultaten van de Associates of Cape Cod. De correlatie tussen de resultaten van de Associates of Cape Cod met verschillende testcentra varieerde van 90,6 tot 99,2%.

NAUWKEURIGHEID

In de nauwkeurigheidsonderzoeken werden tien (10) verschillende monsters elk door drie testcentra getest op drie verschillende dagen. De intra-assay-variatie varieerde van 0,9 tot 28,9%. De intra-assay-waarden varieerde van 3,9 tot 23,8%. De vier (4) negatieve monsters werden van beide analyses uitgesloten.

- 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* ameocyte 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.

ANDERE NIET GECITEERDE REFERENTIES

- 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.

BETEKENIS VAN DE SYMBOLEN

	Niet gebruiken na
	Inhoud voldoende voor <N> tests
	Lotnummer
	Medisch hulpmiddel voor in vitro diagnostiek
	Catalogusnummer
	Temperatuurbegrenzing
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Erkende vertegenwoordiger
	CE-markering
	Associates of Cape Cod® International, Inc. Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, VK