

Deteção de (1→3)-β-D-Glucano no Soro

FUNGITELL®

Instruções de Utilização

	ASSOCIATES OF	Telephone: +1 508 540-3444
	CAPE COD	Linha Verde: +1 888 395-2221
	INCORPORATED	Fax: +1 508 540-8680
124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536		Apoio Técnico: +1 800 848-3248
		Serviço a Clientes: +1 800 525-8378

PN001268-pt

Rev 000 Revisão Dezembro de 2007

USO PREVISTO

A análise Fungitell é um teste enzimático com base zimogénica para deteção qualitativa de (1→3)-β-D-Glucano no soro de pacientes com sintomas ou com complicações que os predisponham a infeções invasivas fúngicas. A concentração no soro de (1→3)-β-D-Glucano, componente fundamental da parede celular de vários fungos importantes do ponto de vista médico, pode ser usada como auxiliar do diagnóstico de micoses e fungemias profundamente implantadas. O resultado positivo não indica a classe de fungo responsável pela infeção.

A análise é indicada para o diagnóstico presuntivo de infeções fúngicas. Deve ser usada em conjunto com outros processos de diagnóstico, como cultura microbiológica, exame histológico de amostras de biopsias e exames radiológicos.

<p>Importante – Recomenda-se que esta informação seja fornecida aos médicos interessados:</p>
<p>A análise Fungitell não detecta certas espécies de fungos, como o género <i>Cryptococcus</i> (9), que produz níveis muito baixos de (1→3)-β-D-Glucano. A análise também não detecta Zygomycetes como <i>Absidia</i>, <i>Mucor</i> e <i>Rhizopus</i> (17) que se sabe não produzirem (1→3)-β-D-Glucano. Adicionalmente, a fase de levedura do <i>Blastomyces dermatitidis</i> produz pouco (1→3)-β-D-Glucano e pode não ser detectada pela análise (18).</p>
<p>Incluir este aviso quando comunicar resultados de testes de determinação de Glucano.</p>

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

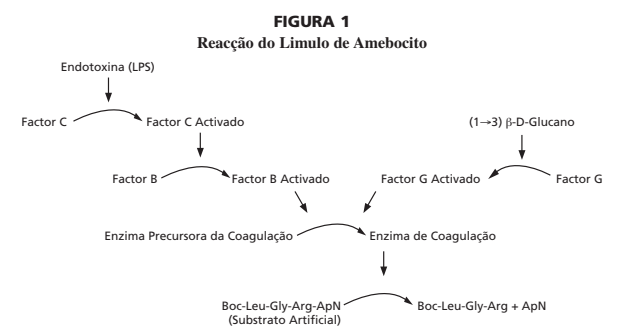
Existe aumento de incidência de infeções fúngicas, quer por patogénicos primários, quer por oportunistas, especialmente em pacientes imunocomprometidos (2,3,4). As doenças invasivas fúngicas, como infeções oportunistas, são comuns entre pacientes de SIDA e de hemopatias malignas e são responsáveis pelo número crescente de infeções hospitalares, particularmente entre receptores de transplantes de órgãos e outros pacientes sujeitos a tratamentos com imunossupressores (1,4). Muitas das doenças por fungos são contraídas pela inalação de esporos dos fungos originários do solo, de detritos de plantas, de sistemas de tratamento do ar e/ou de superfícies expostas. Alguns fungos oportunistas estão presentes em/sobre a pele humana, o tracto intestinal e as membranas mucosas (7). O diagnóstico das micoses invasivas baseia-se normalmente em técnicas radiológicas ou de diagnóstico não específicas.

Os fungos patogénicos primários mais comuns nos humanos são das espécies *Candida* e *Aspergillus*. Os fungos patogénicos oportunistas incluem as espécies *Fusarium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Pneumocystis carinii*. O (1→3)-β -D-Glucano produzido por estes organismos e por outros pode ser detectado pela análise Fungitell (4,5, 16).

PRINCÍPIO DE ADMINISTRAÇÃO

A análise Fungitell mede os níveis de (1→3)-β-D-Glucano. A deteção baseia-se numa modificação da série de reações químicas do lisado de *limulo* de ameobcito (LAL) (8-11), Figura 1. O reagente do Fungitell é modificado para eliminar o Factor C, e portanto, para reagir apenas ao (1→3)-β-D-Glucano, através do sector mediado pelo Factor G.

O (1→3)-β-D-Glucano activa o Factor G, um zimogéneo da protease serina. O Factor G activado converte a enzima precursora da coagulação inactiva em activa, o que por sua vez cinde o ApN do substrato péptido cromogéneo, Boc-Leu-Gly-Arg- ApN, criando um pigmento que absorve a 405 nm. A análise dinâmica Fungitell, descrita abaixo, baseia-se na determinação do aumento da taxa de densidade óptica produzido pela amostra. Esta taxa é interpretada relativamente a uma curva padrão para produzir a avaliação da concentração de (1→3)-β-D-Glucano na amostra.



ARTIGOS FORNECIDOS COM O KIT FUNGITELL

O kit Fungitell destina-se a utilização em diagnóstico *in vitro*. São fornecidos os seguintes artigos em cada kit, que permitem a análise de 110 poços em duas placas microtiter (55 poços cada):

- Reagente Fungitell®, LAL específico liofilizado (1→3)-β-D-Glucano (dois frascos)
- Retardador de Reconstituição Pyrosol, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (dois frascos)
- Padrão de Glucano, Pachyman liofilizado e veiculo inerte com o conteúdo de (1→3)-β -D-Glucano inscrito no rótulo (dois frascos)
- Água grau reagente (RGW) (duas garrafas)
- Microplacas de fundo chato, 96 poços, não revestidas, com cobertura, isentas de glucanos contaminantes (duas)
- KCl 1,2 M (um frasco)
- KOH 0,25 M (um frasco)

Todos os artigos acima, excepto o padrão, estão isentos de níveis de contaminação de (1→3)-β -D-Glucano.

ARTIGOS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Todos os artigos devem estar isentos de glucano contaminante. Os artigos de vidro devem ser esterilizados a ar quente a pelo menos 235°C por 7 horas (ou equivalente reconhecido) antes de se encontrarem aptos para utilização.

- Pontas de Pipeta* (250 µl - Cat# PPT25, 1000 µl - Cat# PPT10)
- Pipetas capazes de ministrar volumes de 5-25 µl, e 100-1000 µl
- Pipetas de passo, com ponta de seringa, capazes de ministrar 100 µl
- Tubos de ensaio* para preparação de series de teste padrão e para combinação dos reagentes de tratamento do soro (13 x 100 mm vidro borossilicato - Cat# TB013)
- Leitor de placa de incubação (37°C) capaz de acompanhamento de largura de banda dupla, a 405 e 490 nm, com intervalo dinâmico mínimo de 2,0 Unidades de Absorção, combinado com software de análise dinâmica assistida por computador.
- Tubos de armazenamento com tampas de enrosnamento, isentos de glucano, para alíquota de amostras (a maioria dos tubos homologados RNase, DNase e apirogénicos estão livres de níveis contaminantes de (1→3)-β -D-Glucano).

7. Parafil®

* Estes produtos, fornecidos por Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), são certificados como livres de glucanos contaminantes.

Atenção-as pipetas de vidro com tampões de algodão são fonte potencial de contaminação por glucano.

AVISOS E PRECAUÇÕES

Este produto destina-se exclusivamente a DIAGNÓSTICO IN VITRO.

<p>A análise Fungitell exige atenção rigorosa à técnica e ao ambiente de teste. A formação total dos técnicos ao método da análise e a evitar contaminações é fundamental para a sua eficácia.</p>
--

- Espécies não detectadas pela análise Fungitell. Certas espécies de fungos produzem níveis muito baixos de (1→3)-β -D-Glucano e não são normalmente detectados pela análise Fungitell. Incluem o género *Cryptococcus* (14,16) e igualmente Zygomycetes como *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus* (16,17). Adicionalmente, a fase de levedura do *Blastomyces dermatitidis* produz pouco (1→3)-β-D-Glucano e pode não ser detectada pela análise (18).
- Não utilizar pipetas bucais. Não fumar, comer ou beber em zonas de manuseamento das amostras ou dos reagentes do kit.
- Criar um ambiente limpo para executar a análise. Utilizar materiais e reagentes certificados como isentos de níveis contaminantes de (1→3)-β-D-Glucano. É de notar que a contaminação fúngica ou de glucano pelo corpo humano, roupas, recipientes, água ou ar podem causar interferência com a análise Fungitell.
- Não utilizar reagentes após o fim da data de validade.

- As amostras de cor diferente ou turvas, nomeadamente as com hemólise ou lipémia visível ou que contenham excesso de bilirrubina podem causar interferências. Se analisadas, os resultados devem ser examinados em busca de interferências ópticas e/ou de padrões dinâmicos de rastreio inabituais.
- Utilizar vestuário de protecção adequado e luvas isentas de pó ao tratar das amostras dos pacientes.
- O soro de pacientes hemodializados pode conter elevados níveis de (1→3)-β-D-glucano quando são utilizadas algumas membranas de diálise de celulose (13). A hemodíálise com membranas de triacetato de celulose ou de polimetacrilato de metilo não afectam aparentemente a análise.
- As gazes e esponjas cirúrgicas podem libertar altos níveis de (1→3)-β-D-glucano, que podem contribuir para resultados temporariamente positivos por contaminação na análise Fungitell, já verificados em pacientes em pós-operatório (6).
- Os kits com conteúdo danificado não devem ser usados.
- Os materiais expostos a fluidos potencialmente contaminados (patogénicos) devem ser eliminados de acordo com a regulamentação local.

Armazenamento dos Reagentes

Armazenar todos os reagentes, conforme fornecidos, entre 2-8°C e ao abrigo da luz. O reagente Fungitell reconstituído deve ser guardado entre 2-8°C e utilizado no prazo de 2 horas. Em alternativa, pode ser congelado a -20°C durante até 20 dias, descongelado uma vez e utilizado.

Manipulação das Amostras

- Recolha de Amostras: As amostras de soro devem ser recolhidas em tubos de vácuo estéreis (tampa vermelha) ou tubos de separação de soro (SST), e deixadas coagular. O soro é então separado do coágulo e decantado para recipiente adequado livre de níveis contaminantes de (1→3)-β-D-glucano.
- Armazenamento das Amostras: As amostras de soro podem ser armazenadas entre 2-8°C antes da análise, ou congeladas a -20º ou temperatura inferior.
- Rotulagem das Amostras: As amostras devem ser claramente rotuladas de acordo com as práticas aprovadas da instituição.

PROCEDIMENTO

Nota: Os parâmetros podem variar com diferentes instrumentos e software. Em geral, aplica-se o seguinte: Configurar o software do leitor de placas para recolher dados em modo Vmean. Confirmar no manual do software os parâmetros correctos para assegurar que o valor calculado seja a taxa média de modificação da densidade óptica de todos os pontos de recolha de dados estabelecidos. O intervalo entre as “leituras” de densidade óptica deve encontrar-se entre 15 – 30 segundos. Os parâmetros de largura de banda do software devem ser de 405 nm menos o segundo plano a 490 nm. Se não estiver disponível leitura a dupla largura de banda, leitura a 405 nm. A temperatura de incubação é estabelecida em 37°C. A placa deve ser agitada, por 5 – 10 segundos, antes do início da leitura. O parâmetro de curva deve ser seleccionado como “linear/linear” ou equivalente. A leitura deve iniciar-se sem tempos mortos.

- Preparação do padrão de glucano fornecido no kit.
 - Dissolver um frasco do padrão de glucano com o volume de água de grau reagente definido no frasco, para criar uma solução de 100 pg/ml. Centrifugar pelo menos 30 segundos para colocar em suspensão (solução 1). A solução de glucano deve ser armazenada a 2-8°C e utilizada no prazo de três dias. Os passos b e a abaixo ilustram um exemplo de esquema de preparação de curva padrão.
 - Preparar padrão de 50 pg/ml misturando 500 µl de água RGW e 500 µl da solução 1 num tubo isento de glucano (solução 2). Centrifugar pelo menos 10 segundos.
 - Preparar padrão de 25 pg/ml misturando 500 µl de água RGW e 500 µl da solução 2 num tubo isento de glucano (solução 3). Centrifugar pelo menos 10 segundos.
 - Preparar padrão de 12,5 pg/ml misturando 500 µl de água RGW e 500 µl da solução 3 num tubo isento de glucano (solução 4). Centrifugar pelo menos 10 segundos.
 - Preparar padrão de 6,25 pg/ml misturando 500 µl de água RGW e 500 µl da solução 4 num tubo isento de glucano (solução 5). Centrifugar pelo menos 10 segundos.
- Preparação do reagente pré-tratamento do soro. O reagente alcalino pré-tratamento do soro converte glucanos de fita tripla em glucanos de fita única (10,11) que reagem melhor à análise. O elevado pH permite também desactivar as proteases de serina e os seus inibidores no soro que fornecem resultados falsos positivos e falsos negativos, respectivamente (20).
 - Preparar o reagente pré-tratamento do soro combinando volumes iguais de 0,25 M KOH e 1,2 M KCl, e centrifugando bem. Os volumes recomendados são de até 900 µl de cada reagente, permitindo duas preparações. Cobrir os frascos com Parafil® para utilização com a segunda placa. Cobrir o frasco com Parafil® usando o lado voltado para o forro de papel.

- Nota: Ao estabelecer a curva padrão, multiplicar a concentração dos padrões por cinco de forma a gama ser entre 500 e 31 pg/ml. Inserir os padrões nos parâmetros do software como 500, 250, 125, 62,5, e 31 pg/ml, respectivamente.

O volume do padrão na análise é de 25 µl por poço ou cinco vezes o volume da amostra de soro. As placas microtiter os padrões (St), controlos negativos (Neg) e 21 desconhecidos (Uk) cada um testado em duplicado, organiza-se da seguinte forma:

	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		Neg	Neg		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
H												

Nota 1: Os poços exteriores podem ser usados, se se demonstrar que o seu desempenho é comparável ao dos internos.

Nota 2: Para evitar contaminações acidentais, voltar a colocar a cobertura na microplaca após inserir as amostras e os reagentes nos poços. Retirar a cobertura antes de colocar a placa no leitor, para evitar interferências ópticas da condensação.

- Adição de soro e de reagente pré-tratamento.
 - Descongelar as amostras de soro congeladas à temperatura ambiente. Centrifugar bem todas as amostras.
 - Transferir 5 µl da amostra de soro para cada um dos seus poços designados (Uk) pelo menos em duplicado. Repetir para cada amostra de soro.
 - Adicionar 20 µl do reagente de pré-tratamento do soro a cada poço que contenha soro. *Nota:* Os passos b e c podem realizar-se em ordem inverse, de acordo com a preferência do técnico.
 - Agitar a placa 5 – 10 segundos para misturar o conteúdo dos poços (pode ser usada a função de agitação da placa do leitor) e depois incubar 10 minutos a 37°C na placa de incubação do leitor.
- Reconstituição do reagente Fungitell. *Nota:* pode efectuar-se adequadamente enquanto a incubação pré-tratamento se processa.
 - Reconstituir um frasco de reagente Fungitell adicionando 2,8 ml de água RGW e adicionando depois 2,8 ml de retardador de reconstituição Pyrosol usando a pipeta de 1000 µl. Cobrir o frasco com Parafil® usando o lado do Parafil® virado para o forro de papel. Girar o frasco suavemente para dissolução completa – não centrifugar.
- Adição dos controlos negativos e dos padrões de glucano. No final da incubação do pré-tratamento do soro (passo 3,d), remover a placa da placa de incubação do leitor e adicionar os padrões e os controlos negativos.
 - Adicionar 25 µl de água RGW aos poços G2 e G3.
 - Adicionar 25 µl da solução padrão 5 - 6,25 pg/ml aos poços F2 e F3.
 - Adicionar 25 µl da solução padrão 4 - 12,5 pg/ml aos poços E2 e E3.
 - Adicionar 25 µl da solução padrão 3 - 25 pg/ml aos poços D2 e D3.
 - Adicionar 25 µl da solução padrão 2 - 50 pg/ml aos poços C2 e C3.
 - Adicionar 25 µl da solução padrão 1 - 100 pg/ml aos poços B2 and B3.
- Adição de reagente Fungitell e procedimento de placa de incubação.
 - Adicionar 100 µl de reagente Fungitell a cada poço (contendo controlos negativos, padrões e amostras) usando a pipeta de passo.
 - Inserir a placa no leitor microplaca (calibrado para 37°C) com a tampa colocada e agitar 5-10 seconds. Ler a placa sem tampa a 405 nm menos 490 nm, por 40 minutos a 37°C. Se não se dispuser de subtracção de segundo plano (a 490 nm), aceita-se a leitura a 405 nm. Se não se dispuser de função de agitação da placa no leitor microplacas, pode ser usado um agitador de microplacas externo.
 - Recolher e analisar os dados da seguinte forma: Calcular a taxa média de mudança de densidade óptica (milí-unidades de absorvância por minuto) para todos os pontos entre 0 e 40 minutos.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados da análise Fungitell devem ser usados no diagnóstico da infeção invasiva por fungos. Os resultados expressam-se em pg/ml de soro e abrangem desde não detectável (<31 pg/ml) a > 500 pg/ml e são impressos pelo software ou lidos a partir da curva padrão. Valores exactos acima de 500 pg/ml exigem que a amostra seja diluída em água RGW e analisada novamente.

O laboratório que executa a análise deve informar o médico que a receita de que o teste Fungitell não detecta algumas espécies de fungos, como *Cryptococcus* (16,17) que produzem níveis muito baixos de (1→3)-β -D-Glucano. O teste também não detecta Zygomycetes como *Absidia*, *Mucor* e *Rhizopus* (16,17) que se sabe não produzirem (1→3)-β-D-Glucano.

Adicionalmente, a fase de levedura do *Blastomyces dermatitidis* produz pouco (1→3)-β-D-Glucano e pode não ser detectada pela análise (18).

RESULTADO NEGATIVO

Valores de (1→3)-β-D-Glucan < 60 pg/ml são interpretados como negativos.

RESULTADO POSITIVO

Valores >80 pg/ml são interpretados como positivos. Um resultado positivo significa que foi detetado (1→3)-β-D-Glucano. Um resultado positivo não define a presença de doença e deve ser usado conjuntamente com outras determinações clínicas para estabelecer um diagnóstico.

RESULTADO INDETERMINADO

Os valores entre 60 to 79 pg/ml sugerem possível infecção fúngicas. É recomendado que se recolha e analise mais soro. A recolha e análise frequente aumenta a utilidade para o diagnóstico.

CONTROLO DE QUALIDADE

- O coeficiente de correlação (r) da curva padrão (linear vs. linear) deve ser > 0,980.
- Os poços com (25 µl de água RGW) são os controlos negativos. Os controlos negativos devem ter taxa de densidade óptica real (Vmean) inferior a 50% do padrão mais baixo. Caso contrário, deve-se repetir a análise usando novos reagentes.
- Tratamento de amostras com problemas. As amostras de cor diferente ou turvas, nomeadamente as com hemólise ou lipémia visível ou que contenham excessos de bilirrubina podem causar interferências devem ser diluídas em água RGW e testadas de novo. A diluição deve ser tida em conta na comunicação dos resultados, multiplicando o resultado pelo factor de diluição. Normalmente, o factor de diluição é inserido nos parâmetros do software para a amostra, sendo a correcção aplicada automaticamente.
- Podem ser usadas amostras de controlo a níveis limite altamente positivos para verificar se os reagentes e a determinação funcionam adequadamente. Cada utilizador da análise deve estabelecer um programa de controlo de qualidade para assegurar a perícia no desempenho dos testes.

LIMITAÇÕES DA ANÁLISE

- A localização dos tecidos das infeções fúngicas (10), o encapsulamento e o montante de (1→3)-β-DGlucano produzido por certos fungos pode afectar a concentração no soro desta análise. A capacidade reduzida de inserir (1→3)-β-D-Glucano na corrente sanguínea pode reduzir a capacidade de detecção de certas infeções fúngicas. As espécies *Cryptococcus* produzem baixos níveis de (1→3)-β-D-Glucano (11) devido ao encapsulamento da célula. Os zygomycetes, incluindo as espécies *Abidia*, *Mucor* e *Rhizopus* (16,17), sabe-se que não produzem (1→3)-β-D-Glucano (16,17). A fase de levedura do *Blastomyces dermatitidis* produz pouco (1→3)-β-D-Glucano e a determinação é geralmente negativa (18).
- Alguns indivíduos possuem elevados níveis de (1→3)-β-D-glucano que se colocam em zona indeterminada. Nesses casos, recomendam-se novos testes.
- A frequência de testes ao paciente depende do risco relativo de infeções fúngicas. São recomendadas frequências de análise de pelo menos duas ou três vezes por semana para pacientes em risco.
- Detectaram-se resultados positivos em pacientes hemodializados (12,13), em sujeitos tratados com certos produtos derivados do sangue como albuminas e imunoglobulinas (19) e em amostras ou sujeitos expostos a contaminação por gaze contendo glucano. Os pacientes necessitam de 3 – 4 dias para se restaurarem os níveis de base de (1→3)-β-D-glucano no soro, após exposição cirúrgica a esponjas e gaze contendo (1→3)-β-D-glucano (6). Consequentemente, o momento da recolha em pacientes cirúrgicos deve ter em conta este prazo.
- As amostras obtidas por picada no calcanhar ou no dedo não devem ser usadas, por a gaze embebida em álcool usada para preparar o local da picada (e potencialmente, a superfície da pele em que se recolhe o sangue) contaminar comprovadamente essas amostras.
- Os níveis de teste foram estabelecidos para adultos. Os níveis pediátricos normais aproximam-se dos dos adultos (21). Não existem dados quanto a recém-nascidos ou crianças de menos de seis meses.
- A gama de detecção da determinação vai de 31 pg/ml a 500 pg/ml. Os valores inferiores a 31 pg/ml devem ser apresentados como < 31 pg/ml. Os valores >500 pg/ml devem ser apresentados como > 500 pg/ml.

SUBSTÂNCIAS CONTAMINANTES

As condições de recolha seguintes podem afectar a exactidão do resultado da análise Fungitell:

- Hemólise
- Turvação da amostra causada por lipémia
- Presença de bilirrubina visualmente detectável
- Soro turvo

VALORES ESPERADOS

Os valores de Beta glucano são elevados em numerosas infeções fúngicas. Quando existem indicadores e sintomas presentes ao nível de 80 pg/ml ou superior, o valor da previsão de que o sujeito é positivo quanto a infeções fúngicas vai de 74.4 a 91.7% (Tabela 2). Na ausência de indicadores e sintomas e com nível inferior a 60 pg/ml, o valor da previsão negativa vai de 65.1% a 85.1%.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Testes Comparativos

Foi efectuado um estudo prospectivo multi-centros para validar as características de desempenho da análise Fungitell. A análise foi comparada com outros métodos correntes de detecção, (i.e., cultura de sangue, exame histopatológico de amostras de biopsia e indicadores radiológicos) para micoses e fungemias.

Foram testados para o estudo trezentos e cinquenta e nove (359) indivíduos. Obteve-se uma amostra única de cada um. Os sujeitos de baixo risco incluíam pessoas aparentemente saudáveis e outros de instalações clínicas, hospitalizados por razões diferentes de infeções fúngicas. A recolha efectuou-se em seis locais clínicos nos Estados Unidos. Quatro das instalações clínicas executaram a análise e testaram um total de 285 amostras. ACC testou a totalidade das 359 amostras duas vezes, usando apenas para o segundo conjunto de resultados para determinar o desempenho da análise. Os resultados do segundo conjunto de análises não foram estatisticamente diferentes do primeiro.

A sensibilidade para o total da população do teste (359) incluindo *Cryptococcus* foi de 65,0% (Intervalo de Confiança (C.I) de 60,1 – 70,0%). A especificidade foi de 81,1% (77,1 – 85,2 % C.I.) (Tabela 1). Os resultados dos quatro locais de teste tiveram uma gama de sensibilidade entre 50,0% e 66,7%. A especificidade various entre 70,0% e 93,0% nas 285 amostras testadas (Tabela 2).

Tabela 1	Resultado dos Testes ACC ao nível limite de 60-80 pg/ml por local							
Local	Provado/Provável Sensibilidade >=80pg/ml			Especificidade <60pg/ml			Equivoco 60<=X<80	Total
	Pos/Clin. Pos	Sensibilidade	Valor Preditivo Positivo	Neg/Clin. Neg	Especificidade	Valor Preditivo Negativo		
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/A	0/0	N/A	0,0	0	1
Total*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

***Inclui uma amostra do local 6.**

Quando os resultados obtidos pela ACC (359 amostras) e pelos locais clínicos (285 amostras) são comparados com diagnósticos clínicos, a sensibilidade é de 64,3% (58,8% - 69,9% CI) para ACC e 61,5% (55,9% - 67,2% CI) para os locais. A especificidade é de 86,6% (82,7% - 90,6% CI) para a ACC contra 79,6% (74,9% - 84,3% CI) para os locais clínicos (Tabela 2).

Tabela 2	Resultado dos Testes dos Locais Clínicos ao nível limite de 60-80 pg/ml por local							
Local	Provado/Provável Sensibilidade >=80pg/ml			Especificidade <60pg/ml			Equivoco 60<=X<80	Total
	Pos/Clin. Pos	Sensibilidade	Valor Preditivo Positivo	Neg/Clin. Neg	Especificidade	Valor Preditivo Negativo		
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. Locais clínicos	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

*** Não é um local de teste**

CANDIDÍASE

Houve 107 indivíduos diagnosticados positivos com candidíase no estudo prospectivo. 83 desses 107 revelaram-se positivos na análise Fungitell.

Foram fornecidas à Associates of Cape Cod cento e setenta e cinco amostras de banco. 145 das 175 foram positivas na análise.

ASPERGILOSE

Um total de 10 sujeitos era positivo a aspergilose. 8 dos 10 foram positivos na análise.

FUSARIOSE

Três sujeitos eram positivos a fusariose. 2 dos 3 foram positivos na análise.

TERAPIA POR DROGAS ANTIFÚNGICAS

A presença ou ausência de terapia por drogas antifúngicas não teve efeito estatístico significativo sobre a sensibilidade da análise. 118 sujeitos revelaram-se positivos a infecção invasiva por fungos sob terapia por antifúngicos. 82 foram positivos na análise (sensibilidade, 69,5%; 61,2% - 77,8% CI). Adicionalmente, vinte e quatro (24) revelaram-se positivos sem qualquer terapia antifúngica. 18 foram positivos na análise (sensibilidade, 75%; 57,7% - 92,3% CI).

ESPECIFICIDADE

Um total de 170 sujeitos era negativo a infeções fúngicas e eram indivíduos aparentemente saudáveis. A especificidade foi de 86.5% na análise (82,8% - 90,1% C.I.). Quando se incluíram os 26 sujeitos negativos a infeções fúngicas mas com outras patologias, observou-se uma especificidade de 81,1% (77,1 - 85,2 % C.I.).

CORRELAÇÕES DOS TESTES

Quatro dos locais clínicos analisaram um total de 285 amostras. Os resultados dos testes nos locais correlacionam-se a 96,4% com os da Associates of Cape Cod. As correlações da Associates of Cape Cod com os vários locais de teste clínico variam entre 90,6 e 99,2%.

PRECISÃO

Nos Estudos de Precisão, analisaram-se individualmente dez (10) amostras diferentes por cada um dos locais de teste, de três formas diferentes. A variação intra-estudo oscilou entre 0,9 e 28,9%. Os valores intra-estudo variaram entre 3,9 e 23,8%. As quatro (4) amostras negativas foram excluídas de ambos os estudos.

- 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-galucan (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 Okada, 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.

REFERÊNCIAS ADICIONAIS NÃO CITADAS

- 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.

LEGENDA DOS SÍMBOLOS

	“Utilizar até”
	“Conteúdo Suficiente Para ‘N’ Testes”
	“Código do Lote”
	“Equipamento Médico Para Diagnóstico In Vitro”
	“N.º de Catálogo”
	“Limite de Temperatura”
	“Fabricante”
	“Consultar as Instruções de Utilização”
	“Representante Autorizado”
	“Marca CE”

EC **REP** **Associates of Cape Cod® International, Inc.**
Deacon Park, Moorgate Road, Knowsley, Liverpool, L33 7RX, Reino Unido