



4. Mit dem Fungitell®-Kit geliefertes Material

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

- Fungitell®-Reagenz, ein lyophilisiertes LAL, das für (1→3)-β-D-Glukan spezifisch ist (zwei Fläschchen).
- Das Fungitell®-Reagenz besteht aus *Limulus(Pfeilswanzkrebs)-Amöbozyten-Lysat* und kolorimetrischem Boc-Leu-Gly-Arg-pNA-Substrat. Es enthält keine menschlichen oder Säugetierproteine.
- Pyrosol®-Rekonstitutionspuffer (zwei Fläschchen). Zusätzliche Fläschchen Pyrosol-Rekonstitutionspuffer (Katalognummer BC051) können separat gekauft werden. Er besteht aus 0,2 M Tris-Puffer.
- Glukanstandard, lyophilisiertes (1→3)-β-D-Glukan von Pachman (zwei Fläschchen). Das zugegebende Volumen an Reagenzwasser ist auf dem Fläschchenetikett angegeben. Es ist gegen einen internen Referenzstandard kalibriert.
- LAL-Reagenzwasser (LRW) (zwei Flaschen)
- Hinweis: 20 ml Wasser in Reagenzqualität (RGW) und LRW in Glasfläschchen sind gleichwertig.
- Alkalische Vorbehandlungslösung (zwei Fläschchen) mit 0,125 M KOH und 0,6 M KCl

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

5. Erforderliches, jedoch nicht mitgeliefertes Material

Alle Materialien müssen frei von interferierendem Glukan sein.

- Pipettenspitzen* (250 µl – Best.-Nr. PPT25, 1000 µl – Best.-Nr. PPT10)
- Pipetten zur Abgabe von Volumina von 5–25 µl und 100–1000 µl
- Repetierpipette mit Spritzenspitzen zur Abgabe von 100 µl
- Teströhren* zur Herstellung der Standardreihe (Kalibrierungskurve) und zur Kombination der Reagenzien zur Serumbehandlung (12 x 75 mm – Best.-Nr. TB240 oder 13 x 100 mm – Best.-Nr. TB013)
- Plattenphotometer mit Inkubatorfunktion (37 °C), das bei 405 nm (vorzugsweise bei zwei Wellenlängen von 405 nm und 490 nm) messen kann und über einen dynamischen Bereich von mindestens 2,0 Absorptionseinheiten verfügt, gekoppelt mit einer geeigneten computerbasierten Software für Kinetiktests
- Sterile, glukanfreie Röhrchen zur Aliquotierung von Proben. Es können Röhrchen verwendet werden, die als RNase-, DNase- und pyrogenfrei geprüft sind.
- Parafilm®
- Mikrotiterplatten mit 96-Kavitäten! Hinweis: Der Fungitell®-Test wurde mithilfe von Platten mit den folgenden Eigenschaften validiert: Polystyren, steril, unbeschichtet, mit flachem Boden, kein störendes β-Glukan gemäß ACC-Spezifikationen und einzeln verpackt.

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

6. Lagerung der Reagenzien

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

7. Warnungen und Vorsichtshinweise

- Nicht mit dem Mund pipettieren. In Bereichen, in denen mit Proben oder Kitreagenzien gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Die betrieblichen und örtlichen Sicherheitsvorschriften befolgen.
- Beim Umgang mit biologischen Proben, die infektiös oder gefährlich sein können, Schutzhandschuhe tragen. Die behandschuhene Hände sollten stets als kontaminiert betrachtet werden; halten Sie Ihre behandschuhene Hände von Augen, Mund und Nase fern. Tragen Sie einen Augenschutz und eine chirurgische Maske, wenn die Möglichkeit einer Aerosolkontamination besteht.
- Hinweis: Kits mit beschädigtem Inhalt dürfen nicht verwendet werden.
- Entsorgung: Rückstände von Chemikalien und Präparationen gelten im Allgemeinen als gefährliche Abfälle. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Für Auskunft zur Entsorgung gefährlicher Abfälle wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder Abfallmanagementunternehmen.

- Die Sicherheitsdatenblätter aller Bestandteile des Fungitell®-Kits können von der ACC-Website heruntergeladen werden: www.acciusa.com.

8.4 Einrichten der Mikrotiterplattenbelegung

Die Mikrotiterplatte mit den Standards (STD), den Negativkontrollen (Neg) und 21 Proben (SPL) im Software-Layout einrichten. Folgendes Layout wird empfohlen:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	STD1 500	STD1 500	SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19			
C	STD2 250	STD2 250	SPL1	SPL4	SPL7	SPL10	SPL13	SPL16	SPL19			
D	STD3 125	STD3 125	SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20			
E	STD4 62,5	STD4 62,5	SPL2	SPL5	SPL8	SPL11	SPL14	SPL17	SPL20			
F	STD5 31,25	STD5 31,25	SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21			
G	neg.	neg.	SPL3	SPL6	SPL9	SPL12	SPL15	SPL18	SPL21			
H												

Die Standardkonzentrationen jeweils als 500, 250, 125, 62,5 und 31 pg/ml in die Software eingeben.

Beachten Sie bitte, dass die eingegebenen Standardkonzentrationen fünfmal höher sind als die im Abschnitt 8.2 oben hergestellten. Das liegt daran, dass das Volumen des im Test verwendeten Standards 25 µl je Kavität beträgt, was das Fünffache des Volumens der verwendeten Serumprobe ist (siehe Abschnitt 8.5 b unten). Somit wird die Serumprobe relativ zum Standard effektiv fünfach verdünnt. Eine fünffache Multiplikation der Standardkonzentrationen kompensiert diese Verdünnung.

Hinweis: Die außenliegenden Kavitäten können verwendet werden, sofern bestätigt wurde, dass ihre Leistung mit der der innenliegenden Kavitäten vergleichbar ist.

Hinweis: Die Negativkontrollen werden nicht in der Standardkurve berücksichtigt.

8.5 Zugabe von Serum und alkalischer Vorbehandlungslösung

- Gefrorene Serumproben bei Raumtemperatur auftauen lassen. Alle Proben auf dem Vortex gut mischen – mindestens 30 Sekunden bei mittlerer bis mittelhoher Geschwindigkeitseinstellung.
- In jede dafür bestimmte Kavität (Uk) 5 µl der Serumprobe mindestens in zweifacher Ausführung übertragen. Für jede Serumprobe wiederholen.
- In jede Kavität mit Serum 20 µl der alkalischen Vorbehandlungslösung zugeben. Sicherstellen, dass die Tröpfchen vom Serum und der Vorbehandlungslösung miteinander in Kontakt kommen.
- Hinweis: Die Schritte b und c können je nach Präferenz des Anwenders in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden.
- Hinweis: Nach Zugabe von Proben und Vorbehandlungsreagenz den Deckel der Mikrotiterplatte wieder aufsetzen, um eine versehentliche Kontamination zu vermeiden.
- Die Platte 5 bis 10 Sekunden lang schütteln, um den Inhalt der Kavitäten zu mischen (dazu kann die Plattenschüttelfunktion des Photometers verwendet werden), und anschließend für 10 Minuten bei 37 °C im Photometer mit Inkubator inkubieren.

8.6 Rekonstitution des Fungitell®-Reagenzes

Hinweis: Dieser Schritt kann der Einfachheit halber bereits während der Vorbehandlungskultivation durchgeführt werden. Die Konsistenz des Rekonstitutionszeitpunkts verbessert die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, da die Fungitell®-Reaktion direkt nach der Rekonstitution beginnt, allerdings erst auf einem niedrigen Niveau.

Ein Fläschchen Fungitell®-Reagenz durch die Zugabe von 2,8 ml LRW und die anschließende Zugabe von 2,8 ml Pyrosol-Rekonstitutionspuffer mithilfe der 1000-µl-Pipette rekonstituieren. Das Fläschchen mit Parafilm abdecken, wobei die den Schuttpapier zugewandte Seite des Parafils verwendet wird. Das Fläschchen vorsichtig schwenken, um das Reagenz vollständig zu lösen – nicht vorwärmen.

8.7 Zugabe von Negativkontrollen und Glukanstandards

Nach Beendigung der Serumvorbehandlungskultivation (Abschnitt 8.5 d) die Platte aus dem Plattenphotometer nehmen und die Standards und Negativkontrollen in die Platte geben. Empfohlene Belegung für die Standards:

- In die Kavitäten G2 und G3 25 µl LRW geben.
- In die als 31,25 pg/ml gekennzeichneten Kavitäten F2 und F3 25 µl der Standardlösung 5 (6,25 pg/ml) geben.
- In die als 62,5 pg/ml gekennzeichneten Kavitäten E2 und E3 25 µl der Standardlösung 4 (12,5 pg/ml) geben.
- In die als 125 pg/ml gekennzeichneten Kavitäten D2 und D3 25 µl der Standardlösung 3 (25 pg/ml) geben.
- In die als 250 pg/ml gekennzeichneten Kavitäten C2 und C3 25 µl der Standardlösung 2 (50 pg/ml) geben.

8.8 Öffnen der alkalischen Vorbehandlungslösung

Die alkalische Vorbehandlungslösung wandelt Glukane mit Dreifachhelix zu einzelsträngigen Glukanen um^{17,18}, die im Test reaktiver sind. Der alkalische pH-Wert inaktiviert außerdem die Proteasen und Inhibitoren im Serum, die den Test stören könnten.²⁴

Das Fläschchen (gemäß Laborverfahren) entsorgen, es sei denn, es soll in einem nachfolgenden Test verwendet werden. In diesem Fall das Fläschchen mit Parafilm abdecken, wobei die dem Schuttpapier zugewandte Seite des Parafils verwendet wird.

- f. In die als 500 pg/ml gekennzeichneten Kavitäten B2 und B3 25 µl der Standardlösung 1 (100 pg/ml) geben.

8.8 Zugabe des Fungitell®-Reagenzes und Platteninkubationsverfahren

- a. In jede Kavität (mit Negativkontrollen, Standards und Proben) mithilfe der Repetierpipette (Stepper) 100 µl Fungitell®-Reagenz geben.
- b. Die Platte mit aufgesetztem Deckel in das (auf 37 °C äquiliabierte) Mikroplattenthermometer stellen, Deckel abnehmen und 5 bis 10 Sekunden lang schütteln. Wenn das Mikroplattenthermometer nicht über eine Plattschüttelfunktion verfügt, kann ein externer Mikroplattenschüttler verwendet werden.

Die Platte ohne Deckel bei 405 nm minus 490 nm für 40 Minuten bei 37 °C messen.

Hinweis: Wenn das Instrument keine Zeit lässt, um zwischen Schüttel- und Messvorgang den Deckel abzunehmen, ohne Deckel schütteln, um sicherzustellen, dass ohne Deckel gemessen wird.

9. Berechnung der Ergebnisse

Die Daten erfassen und wie folgt analysieren: Die Kinetikplots der Testproben untersuchen und auf andere Muster als einen glatten Anstieg hin überprüfen, die mit den Standards vergleichbar sind. Plots, die eine optische Interferenz zeigen (z. B. mit kinetischen Mustern, die nicht denen der Standards folgen), ungültig machen. Die mittlere Rate der Veränderung der optischen Dichte (Milliabsorptionseinheiten je Minute) für alle Punkte zwischen 0 und 40 Minuten berechnen (ausgeführt durch die Software). Die (1→3)-β-D-Glukan-Probenkonzentrationen aus der Standardkurve interpolieren (ausgeführt durch die Software).

10. Qualitätskontrolle

- Der Korrelationskoeffizient (r) der Standardkurve (linear vs. linear) sollte $\geq 0,980$ betragen.
- Die Kavitäten mit 25 µl LRW sind die Negativkontrollen. Negativkontrollen sollten Ratenergebnisse (z. B. Milliabsorptionseinheiten je Minute) von weniger als 50 % des kleinsten Standards aufweisen. Ist dies nicht der Fall, muss der Test unter Verwendung frischer Reagenzien wiederholt werden.
- Handhabung komplexer Proben. Wenn der Analyst beim Test einer verfärbten oder trüben (wie eine stark hämolysiert, lipämische oder stark bilirubinhaltige) Probe eine ungewöhnliche Kinetik beobachtet, muss die Probe in LRW verdünnt und der Test wiederholt werden. Der Verdünnungsfaktor ist in der Angabe der Ergebnisse durch Multiplizieren des Ergebnisses mit dem Verdünnungsfaktor Rechnung zu tragen. Typischerweise wird der Verdünnungsfaktor in die Softwaredaten der Probe eingegeben und die Korrektur erfolgt automatisch.
- Hinweis:**
 - Jeder Anwender des Tests sollte ein Qualitätskontrollprogramm gemäß den Vorschriften der jeweiligen Einrichtung etablieren, um die Befähigung zur Durchführung des Tests sicherzustellen.
 - Es wird empfohlen, im Rahmen weiterer Laborkontrollen und einer guten Laborpraxis Serumkontrollproben (negativ, grenzwertnah oder stark positiv) zu testen. Diese sind nicht im Fungitell®-Kit enthalten.

11. Auswertung der Ergebnisse

NEGATIVES ERGEBNIS

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

Da den Test durchführende Labor sollte den anfordernden Arzt darüber in Kenntnis setzen, dass nicht alle Pilzinfektionen zu erhöhten Mengen an (1→3)-β-D-Glukan im Serum führen. Manche Pilzarten, beispielsweise die Gattung *Cryptococcus*^{3,4}, produzieren sehr wenig (1→3)-β-D-Glukan. Mucorale wie *Aspergillus*, *Mucor* und *Rhizopus*^{4,5} sind nicht bekannt dafür, (1→3)-β-D-Glukan zu produzieren. Gleichermassen produziert *Blastomyces dermatitidis* in der Hefephase wenig (1→3)-β-D-Glukan und bei Blastomykose-Patienten liegen üblicherweise Mengen an (1→3)-β-D-Glukan vor, die der Fungitell®-Test nicht nachweisen kann⁵.

AMBIVALENTES ERGEBNIS

Werte von 60 bis 79 pg/ml gelten als unschlüssig. Es empfiehlt sich die Entnahme und die Testung weiterer Seren. Häufige Probennahme und Testung verbessern den Nutzen für die Diagnosstellung.

POSITIVES ERGEBNIS

(1→3)-β-D-Glukan-Werte ≥ 80 pg/ml gelten als positives Ergebnis. Ein positives Ergebnis definiert nicht das Vorhandensein einer Krankheit und ist zur Diagnosstellung nur in Verbindung mit anderen klinischen Befunden zu verwenden.

12. Grenzen des Tests

- Das Gewebe der Pilzinfektion¹⁰, die Verkapselung und die Menge an von bestimmten Pilzen produziertem (1→3)-β-D-Glukan können die Serumkonzentration dieses Analyten beeinflussen. Eine verminderte Fähigkeit, (1→3)-β-D-Glukan in den Blutkreislauf abzugeben, kann die Fähigkeit zum Nachweis bestimmter Pilzinfektionen verringern.
- Manche Personen weisen einen erhöhten Spiegel an (1→3)-β-D-Glukan auf, der in den ambivalenten Bereich fällt. In solchen Fällen werden zusätzliche Tests angeraten.
- Die Häufigkeit der Testung eines Patienten richtet sich nach dem relativen Risiko einer Pilzinfektion. Bei Risikopatienten empfiehlt sich eine Probennahme mit einer Häufigkeit von mindestens zwei bis drei Mal pro Woche.

- Bei Hämodialysepatienten^{19,20,38} und Testpersonen, die mit bestimmten fraktionierten Blutprodukten wie Serumalbumin und Immunglobulinen behandelt worden sind^{3,22}, sowie bei Proben bzw. Testpersonen, die glukanhaltiger Gaze und glukanhaltigen chirurgischen Schwämmen ausgesetzt waren, erhält man positive Ergebnisse. Es dauert 3 bis 4 Tage, bis die Patienten wieder auf ihren Basisspiegel an (1→3)-β-D-Glukan im Serum zurückfallen, nachdem sie während einer Operation mit Schwämmen und Gaze in Kontakt waren, die (1→3)-β-D-Glukan enthalten^{21,22}. Der Zeitpunkt der Probennahme bei Operationspatienten ist entsprechend darauf abzustimmen.
- Proben, die mit der Fersen- oder Fingerpunktmethode genommen werden, sind ungeeignet, da die zur Vorbereitung der Entnahmestelle verwendete alkoholgetränktes Gaze (und möglicherweise auch die Blutansammlung auf der Haut) die Proben nachweislich kontaminiert. In den bisherigen Studien wurden keine Unterschiede zwischen über Venenkatheter und mittels Venenpunktion entnommenen Proben beobachtet^{26,27}.
- Für einen umfassenden Überblick über die Faktoren, die zu falsch positiven (1→3)-β-D-Glukan beitragen, siehe Finkelman, MA, Journal of Fungi (2021)³⁹.
- Die Testkonzentrationen wurden bei erwachsenen Testpersonen bestimmt. Normal- und Grenzwertkonzentration für Säuglinge und pädiatrische Patienten sind Gegenstand der Forschung^{28,29}.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Cut-off- und erwartete Werte

Eine prospektive multizentrische Studie³¹, die zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität des Fungitell®-Tests (siehe Vergleichstests unten) durchgeführt wurde, hat gezeigt, dass die Beta-Glukan-Werte bei einer Vielzahl von Pilzinfektionen erhöht sind. Wenn bei einer Konzentration von 80 pg/ml oder darüber Anzeichen und Symptome vorhanden sind, liegt der prädiktive Wert der Wahrscheinlichkeit, dass die Testperson positiv auf eine Pilzinfektion ist, bei 74,4 % bis 91,7 %. Bei Nichtvorhandensein von Anzeichen und Symptomen bei unter 60 pg/ml liegt der negative prädiktive Wert bei 65,1 % bis 85,1 %.

13.2 Klinische Leistung

Es wurde eine prospektive multizentrische Studie durchgeführt, um die Leistungsmerkmale des Fungitell®-Tests zu validieren³. Der Test wurde mit anderen Standardnachweisverfahren für Mykosen und Fungämien verglichen (d. h. Blutkultur, histopathologische Untersuchung von Biopsieproben und radiologische Anzeichen).

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

• Diagnostische Sensitivität

Die Sensitivität in der gesamten Population an Testpersonen (359) einschließlich Kryptokokkose-Patienten betrug 65,0 % [60,1 %–70,0 %, 95 %-Konfidenzintervall (KI)] (Tabelle 1).

• Diagnostische Spezifität

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

Tabelle 1 Testergebnisse von ACC bei Verwendung der Cutoffkonzentration von 60–80 pg/ml nach Prüfstelle

Testzentrum	Bestätigt/wahrscheinlich Sensitivität ≥ 80 pg/ml		Spezifität < 60 pg/ml		Ambivalent 60–< X < 80	Gesamt		
	pos/ kl. pos.	Sensitivität	Positiver prädiktiver Wert	neg/ kl. neg.	Spezifität			
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	k. A.	0/0	k. A.	0,0	0	1
Gesamt	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

Bei Vergleich der von ACC erhaltenen Ergebnisse (359 Proben) und der von den klinischen Prüfstellen erhaltenen Ergebnisse (285 Proben) mit der klinischen Diagnose beträgt die Sensitivität bei ACC 64,3% (58,8 %–69,9 % KI) und bei den

Prüfstellen 61,5 % (55,9 %–67,2 % KI). Die Spezifität bei ACC beträgt 86,6 % (82,7 %–90,6 % KI) gegenüber 79,6 % (74,9 %–84,3 % KI) bei den Prüfstellen.

Candidose

In der prospektiven Studie gab es 107 Testpersonen, die positiv mit einer Candidose diagnostiziert wurden, von denen 83 mit dem Fungitell®-Test als positiv nachgewiesen wurden.

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

Aspergillose

Insgesamt 10 Testpersonen waren positiv auf Aspergillose. 8 von 10 waren im Assay positiv.

Fusariose

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

Therapie mit Antimykotika

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

13.3 Testkorrelationen

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

13.4 Präzision

Der Fungitell®-Test wurde auf Präzision (d. h. Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit) unter Verwendung von zehn (10) verschiedenen Proben untersucht, die jeweils an drei verschiedenen Tagen von drei Testzentren getestet wurden. Die Intra-Assay-Variabilität lag im Bereich von 0,9 % bis 28,9 % und diente als Maß für die Reproduzierbarkeit. Die Inter-Assay-Werte lagen im Bereich von 3,9 % bis 23,8 % und dienten als Maß für die Reproduzierbarkeit. Die vier (4) negativen Proben wurden aus beiden Analysen ausgeschlossen.

13.5 Messbereich und Messlinearität

Die Ergebnisse sind ausgedruckt in pg/ml Serum und liegen im Bereich zwischen nicht nachweisbar (< 31 pg/ml) und > 500 pg/ml und werden von der Software ausgedruckt oder von der Standardkurve abgelesen. Genaue Werte über 500 pg/ml erfordern eine Verdünnung der Probe in LAL-Reagenzwasser und eine Wiederholung des Tests. Wie im Abschnitt „Qualitätskontrolle“ angegeben, sollte der Korrelationskoeffizient (r) der Standardkurve im Messbereich des Fungitell®-Tests (linear vs. linear) $\geq 0,980$ sein und die Negativkontrollen sollten Ratenwerte (z. B. Milliabsorptionseinheiten/Minute) von weniger als 50 % des kleinsten Standards aufweisen. Ist dies nicht der Fall, muss der Test unter Verwendung frischer Reagenzien wiederholt werden.

13.6 Interferierende Substanzen

Folgende Probenzustände können mit einem akkurate Fungitell®-Testergebnis interferieren:

- Verfärbte oder trübe Proben, beispielsweise solche, die stark hämolysiert, lipämisch oder stark bilirubinhaltig sind, können beim Test eine optische Interferenz verursachen. Werden solche Proben getestet, sind die Testergebnisse auf Hinweise einer optischen Interferenz und/oder einen ungewöhnlichen kinetischen Verlauf zu untersuchen.
- Ein erhöhter Immunoglobulin-G-Spiegel, wie er im Serum aufgrund multipler Myelome vorkommen kann, kann nach der Zugabe von Fungitell® zum vorbehandelten Serum zu einer Ausfällung in der Reaktionsmischung führen³⁰.
- Bis heute ist keine weitere aktivierende Substanz für den Faktor G ((1→3)-β-D-Glukan-Nachweiselement) des Fungitell®-Reagenzies mit Ausnahme von (1→3)-β-D-Glukan bekannt. In einigen Studien, in denen Aussagen über Kreuzreakтивität gemacht wurden, hat die Behandlung des angeblich aktivierenden Materials mit gereinigter (1→3)-β-D-Glukanase das Signal eliminiert, was zeigt, dass die beobachtete Aktivierung auf eine Kontamination mit (1→3)-β-D-Glukan zurückzuführen war¹⁵. Eine Serinprotease-Kontamination kann auch zur Freisetzung von para-Nitroanilin in Fungitell®-Reaktionsmischungen führen, diese werden jedoch im Rahmen des Vorbehandlungsprozesses inaktiviert.

14. Meta-Analysen

Zusätzlich wurden zahlreiche Peer-Review-Studien zum Thema Serum-(1→3)-β-D-Glukan-basierte Unterstützung für die Diagnose invasiver Pilzerkrankungen einschließlich Meta-Analysen zur diagnostischen Leistung veröffentlicht^{32,33,34,35,36,37}.

15. Symbollegende

	Verwendbar bis		Gebrauchsanweisung beachten
	Inhalt ausreichend für „N“ Tests		Bevollmächtigter in der EU
	Chargenbezeichnung		CE-Zeichen
	In-vitro-Diagnostikum		Verschreibungspflichtig
	Bestellnummer		Vorsicht
	Temperaturbegrenzung		Vor Sonnenlicht schützen
	Hersteller		Importeur
	Bevollmächtigter in der Schweiz		

16. Bevollmächtigter/Importeur

	Emergo Europe, Westervoortsedijk 60, 6827 AT Arnhem, Nederland
	Bevollmächtigter in der Schweiz MedEnvoy Schweiz Gotthardstrasse 28, 6302 Zug, Schweiz
	Importeur MedEnvoy Global B.V. Prinses Margrietplantsoen 33-Suite 123 2595 AM Den The Hague, Nederland

Australischer Sponsor:
Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park
201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000, Australien

Hinweis: Alle im Zusammenhang mit dem Produkt aufgetretenen schwerwiegenden Vorkommnissen sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaats zu melden, in dem der Anwender und/oder der Patient ansässig sind/ist.

17. Kontaktdaten

Konzernzentrale – Associates of Cape Cod, Inc.
Tel.: 888 395-2221 oder 508 540-3444 • Fax: 508 540-8680
E-Mail: custservice@accusa.com • www.accusa.com

Vereinigtes Königreich/Europa – Associates of Cape Cod Int'l, Inc.

Unit 1 F/G/H Academy Business Park, Lees Road
Knowley, Liverpool L33 7SA, Vereinigtes Königreich
Tel.: +44 151 547-7444 • Fax: +44 151 547-7400
E-mail: info@acciu.co.uk • www.acciu.co.uk

18. Revisionsverlauf

Rev. 0 bis 11: Dreifachbestimmung in Doppelbestimmung geändert. Wasser in Reagenzqualität durch LAL-Reagenzwasser ersetzt. Die Komponenten KCl und KOH als eine „alkalische Vorbehandlungslösung“ zusammengelegt. Die Mikrotiterplatte wurde aus dem Kit entfernt und wird als erforderlicher aber nicht im Lieferumfang enthaltener Artikel angeboten. Den EU-Bevollmächtigten geändert und australischen Sponsor hinzugefügt. Geringfügige Klarstellungen, Formatierungen, Hinzufügung von Symbolen und zusätzlichen Störsubstanzen.

Rev. 12: EU-Bevollmächtigten Emergo Europe entfernt.

Rev. 13: Adresse im Vereinigten Königreich aktualisiert und Deutschland entfernt. MedEnvoy als EU-Importeur hinzugefügt und ACC Europe GmbH aus Abschnitt 17 entfernt. Geringfügige grammatische Fehler korrigiert. Aktualisierte Symbole verwendet. Name und Adresse des EU-Bevollmächtigten, des Importeurs in der Schweiz und des Bevollmächtigen in der Schweiz hinzugefügt.

19. Referenzen

- Odabasi, Z., Paetzick, 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.
- De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious Disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin. Inf. Dis. 46: 1813-1821.
- Miyazaki, T., Kohno, S., Mitutake, K., Masaaki, S., Tanaka, K.-I., Ishikawa, N., and Hara, K. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glukan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. J. Clinical Microbiol. 33: 3115-3118.
- Binder, U., Maurer, E., and Lass-Florl, C. 2014. *Mucormycosis* – from the pathogen to the disease. Lin. Microbiol. Infect. 20 (Suppl 16): 60-66.
- Giroud, 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.

6. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl Infect Dis.* 1999; 1:247-261.
7. Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. *New England Journal of Medicine.* 1998; 338:1741-1751.
8. Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H., Yasoaka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)- β -D-Glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet.* 345: 17-20.
9. Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Micro Rev.* 9: 499-511.
10. Alexander, B. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infect Dis.* 2002; 4 (Suppl 3):32-37.
11. Lass-Florl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 52: 197-205.
12. Nucci, M. and Anaisse, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation: focus on aspergillosis. *Clin Chest Med.* 30: 295-306.
13. Litvinova, A.P., Lindsley, M.D., Gade, L., Smith, R., Chiller, T., Lyons, J.L., Thakur, K.T., Zhang, S.X., Grigorchuk, D.E., Kerkerin, T.M., Brandt, M.E., and Park, B.J. Utility of (1→3)- β -D-Glucan testing for diagnostics and monitoring response to treatment during the multistate outbreak of fungal meningitis and other infections. *J Clin Microbiol.* 2015; 53:618-25.
14. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Sacki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2004. β -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.
15. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in Limulus. *Thrombosis Res.* 68: 1-12.
16. 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.
17. 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 amebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydrate Res.* 217:181-190.
18. 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 glucan with identical degree of polymerization but different conformations. *J Biochem.* 113:683-686.
19. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. 2001. Influence of various hemodilution membranes on the plasma (1→3)- β -D-Glucan level. *Kidney International.* 60: 319-323.
20. Kato, A., Takita, T., Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, K., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)- β -D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron.* 89:15-19.
21. Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hatta, M., Yamamoto, N., Kunishima, H., Yanai, H., Kaku, K., Hirakat, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)- β -D-Glucan derived from different gauze types. *Tohoku J Exp Med.* 217: 117-121.
22. Mohr, J., Paetzsch, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β -glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU). *ICAAC Poster #M-1468.*
23. Held, J., Wagner, D. β -D-Glucan kinetics for the assessment of treatment response in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:118-22.
24. Tamura, H., Arima, 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.
25. Ogawa, M., Hori, H., Niigushi, S., Arai, E., and Kuroda, Y. 2004. False-positive plasma (1→3)- β -D-Glucan following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow transplant patients. *Int J Hematol.* 80: 97-98.
26. Recil, Z., Kocmanova, I., Langrova, M., Weinbergrova, B., Bursovova, L., Toskova, M., Winterova, J., Timulsina, S., Rodriguez, I., and Mayer, J. Difficulties in using 1,3- β -D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies—high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol.* 2010; 59:1016-22.
27. Postoraro, B., De Pascale, G., Tumbarello, M., Torelli, R., Pennisi, M.A., Bello, G., Maviglia, R., Fadda, G., Sanguineti, M., and Antonelli, M. 2011. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1→3)- β -D-glucan assay, Candida score, and colonization index. *Crit Care.* 15: R249.
28. 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.
29. Goudjil, S., Kongyo, G., Dusol, L., Imestouren, F., Cornu, M., Leke, A., and Chouaki, T. 2013. (1→3)- β -D-glucan levels in candidiasis infections in the critically ill neonate. *J Maternal-Fetal and Neonatal Med.* 26: 44-48.
30. Issa, N.C., Koo, S., Lynch, R.C., Gay, C., Hammond, S.P., Baden, L.R., Ghorial, I.M., Finkelman, M.A., and Marty, F.M., 2012. Serum galactomannan and (1→3)- β -D-glucan assays for patients with multiple myeloma and Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Microbiol.* 50:1054-6.
31. Ostrosky-Zeichner, L., Kongyo, G., Dusol, L., Vazquez, J., Pappas, P.G., Sacki, F., Ketchum, P.A., Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multi-center clinical evaluation of the (1→3)- β -D-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin. Inf. Dis.* 41: 299-305.
32. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Nitziou F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2011;52:750-70.
33. Hou TY, Wang SH, Liang SX, Jiang WX, Luo DD, Huang DH. The Screening Performance of Serum 1,3-Beta-D-Glucan in Patients with Invasive Fungal Diseases: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *PLoS One.* 2015 Jul 6;10:e0131602.
34. Lamoth, F., Cruciani, M., Mengoli, C., Castagnola, E., Lortholary, O., Richardson, M., Marchetti, O. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis.* 2012; 54:633-43.
35. Onishi, A.I., Sugiyama, D., Kogata, Y., Saegusa, J., Sugimoto, T., Kawano, S., Morinobu, A., Nishimura, K., Kumagai, S. Diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:7-15.
36. Karageorgopoulos DE, Qu JM, Koribala IP, Zhu YG, Vasiliou VA, Falagas ME. Accuracy of β -D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19:39-49.
37. He, S.I., Hang, J.P., Zhang, L.Z., Wang, F.Z., Zhang, D.C., Gong, F.H. A systematic review and meta-analysis of diagnostic accuracy of serum 1,3- β -D-glucan for invasive fungal infection: Focus on cutoff levels. *J Microbiol Immunol Infect.* 2015 Aug;48:351-61.
38. Wong, J., Zhang, Y., Patidar, A., Vilar, E., Finkelman, M., Farrington, K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role of (1→3)- β -D-Glucan. *PLoS One.* 2016 Oct 20;11(10):e0164978. doi: 10.1371/journal.pone.0164978. eCollection 2016.
39. Finkelman, M. Specificity Influences in (1→3)- β -D-Glucan-Supported Diagnosis of Invasive Fungal Disease. *J Funct (Basel)* 2020 Dec 29;7(1):14.

Weitere Referenzen finden Sie auf unserer Website Fungitell.com.

Eine Kurzanleitung des Testverfahrens kann von der Website Fungitell.com heruntergeladen werden:
https://www.fungitell.com/pdfs/Fungitell_ProcedureOutline_PR18-016.pdf